



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

LUMA COLLINO

**EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO PULSADO NA
OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES: estudo histomorfométrico em
ratos**

2022

LUMA COLLINO

**EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO PULSADO NA OSSEOINTEGRAÇÃO
DE IMPLANTES: estudo histomorfométrico em ratos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia,
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte
das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida Neves Jardimi

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Collino, Luma

Efeito do campo eletromagnético pulsado na osseointegração de implantes: estudo histomorfométrico em ratos / Luma Collino. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
50 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Graduação em Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardim
Coorientadora: Camilla Magnoni Moretto Nunes

1. Campo eletromagnético . 2. Osseointegração. 3. Ratos. I. Jardim, Maria Aparecida Neves, orient. II. Nunes, Camilla Magnoni Moretto, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Assoc. Dra. Maria Aparecida Neves Jardimi (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Diagnóstico e Cirurgia

Prof^a. Dra. Andrea Carvalho De Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Diagnóstico e Cirurgia

Prof. Assoc. Dr. Sergio Lucio Pereira Castro Lopes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Diagnóstico e Cirurgia

São José dos Campos, 05 de julho de 2022.

DEDICATÓRIA

À Deus, por me sustentar e possibilitar mais essa conquista na minha vida. Aos meus amados pais Célia e Sérgio, que não medem esforços para me apoiar em todos os meus sonhos. Ao meu marido Guilherme, que acredita em mim mais do que eu mesma. E aos meus avós Amílcar (*in memorian*), Tereza (*in memorian*) e Aristides (*in memorian*), que mesmo em outro plano, para sempre viverão em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo amor e pela misericórdia derramada sobre a minha vida, dando-me forças e coragem para seguir.

Aos meus amados pais, Célia e Sérgio, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais desafiadores e mais felizes da minha vida. A vocês, todo o meu amor e minha gratidão.

Ao meu companheiro de vida Guilherme, que viveu o sonho acadêmico comigo. Obrigada por me fazer rir todos os dias, a vida é mais linda, leve e divertida ao seu lado. Eu te amo.

A minha tia Sueli, que me mostrou a beleza da leitura, dos estudos e das viagens. Obrigada por acreditar tanto em mim. Eu te amo.

A minha orientadora Prof^a Ucha, por ser sempre solícita e generosa comigo, desde quando bati na porta de sua sala pedindo por um projeto, até a construção do presente trabalho. A você, toda a minha admiração e gratidão.

A minha coorientadora, Dra. Camilla, por sanar todas as minhas dúvidas do trabalho com muita paciência e carinho. A você, minha gratidão.

Aos meus amigos, pela companhia durante esses 6 anos e meio, de aulas, laboratórios e clínicas. A vocês desejo muito sucesso e felicidade na nossa profissão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa, através do Processo nº 2018/17850-0, no período de 01/08/2019 a 31/07/2020.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT UNESP pela colaboração para a minha formação profissional e pessoal. A vocês, minha mais profunda gratidão.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT UNESP, em especial ao Rafa, pelo auxílio na correção do presente trabalho. A vocês, minha gratidão.

Agradeço ao Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT UNESP, minha escola do coração, por mais essa oportunidade de formação.

"Não se preocupe com falhas, preocupe-se com as chances que você perde quando não tenta". Jack Canfield

RESUMO

Collino L. Efeito do campo eletromagnético pulsado na osseointegração de implantes: estudo histomorfométrico em ratos [trabalho de conclusão de curso]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

Introdução: a terapia com implantes osseointegrados é uma abordagem clínica dependente do processo de osseointegração. Com a necessidade de uma reabilitação em menor tempo, a aplicação do campo eletromagnético pulsado (CEMP) na osseointegração tem sido alvo de estudos. Esta é uma terapia não invasiva capaz de promover uma efetiva formação e quantidade de osso em contato com a superfície do implante em menor tempo, aumento no grau de mineralização e maturação óssea. Entretanto, essa terapia não resultou em melhora significativa do processo de osseointegração. Com isso, questiona-se a utilização de protocolos que envolvem diferentes parâmetros do CEMP nos resultados disponíveis. **Objetivo:** verificar a possibilidade de um protocolo que aborde, a partir de parâmetros fixos do CEMP, duração ideal para a otimização da osseointegração. **Materiais e métodos:** foram utilizados 60 animais (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) randomizados em 3 grupos experimentais: grupo controle (GC), grupo teste A (GTA) e grupo teste B (GTB). Todos os animais receberam implantes na tíbia esquerda, porém apenas os dos grupos testes (GTA e GTB) receberam aplicação do CEMP com parâmetros fixos de $\pm 1\text{mT}$, 15 Hz, com 25 ciclos repetidos por 200 microssegundos. Em cada um dos três grupos, os animais foram subdivididos em 4 subgrupos de acordo com os períodos de eutanásia de 03, 07, 21 e 45 dias. No GC foi apenas instalado o implante na tíbia esquerda dos animais; no GTA e GTB, após a instalação do implante na tíbia esquerda, os animais foram expostos por 3h e 1h/dia ao CEMP, respectivamente, até o período de eutanásia dos subgrupos. As peças foram separadas e preparadas sem descalcificação para as análises histomorfométricas que será realizada através do software *Image J* (*NIH Image J* 1.34) dos parâmetros: porcentagem de contato osso-implante (*bone implant contact* - BIC); e porcentagem de área de fração óssea (*bone area fraction occupied* - BAFO). Os dados foram tabulados e aplicados testes estatísticos apropriados, com nível de significância de 5%. **Resultados:** revelaram, na avaliação intergrupos da BIC, que em 03 dias houve maior quantidade de osso em contato com o implante nos grupos GTA e GTB em comparação ao GC ($p=0.044$ e 0.017 , respectivamente). Em 07 dias, o GTB apresentou maior BIC em comparação ao GC ($p=0.017$). Nos demais períodos não houve diferenças intergrupos para este parâmetro histomorfométrico. Na avaliação intergrupos do BAFO constatou-se que não houve diferenças estatísticas em nenhum dos períodos avaliados. **Conclusão:** a utilização do CEMP como um bioestimulador ao processo de osseointegração mostrou maior quantidade de osso em contato com o implante nos grupos GTA e GTB em comparação ao GC nos períodos iniciais do estudo.

Palavras-chave: campo eletromagnético; osseointegração; ratos.

ABSTRACT

Collino L. *Effect of pulsed electromagnetic field on implants osseointegration: study histomorfométric in rats [graduation final work]*. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

Introduction: therapy with osseointegrated implants is a clinical approach dependent on the osseointegration process. With the need for rehabilitation in less time, the application of pulsed electromagnetic field (PEMF) in osseointegration has been the subject of studies. This is a non-invasive therapy capable of promoting an effective formation and amount of bone in contact with the implant surface in a shorter time, increasing the degree of mineralization and bone maturation. However, this therapy did not result in a significant improvement in the osseointegration process. Thus, the use of protocols involving different PEMF parameters in the available results is questioned. **Objective:** to verify the possibility of a protocol that addresses, from fixed parameters of the PEMF, the ideal duration for the optimization of osseointegration. **Materials and methods:** 60 animals (*Rattus norvegicus*, albinus variation, Wistar) were randomized into 3 experimental groups: control group (CG), test group A (TGA) and test group B (TGB). All animals received implants in the left tibia, but only those in the test groups (TGA and TGB) received PEMF application with fixed parameters of $\pm 1\text{mT}$, 15 Hz, with 25 cycles repeated for 200 microseconds. In each of the three groups, the animals were subdivided into 4 subgroups according to the euthanasia periods of 03, 07, 21 and 45 days. In the CG, the implant was only installed in the animals' left tibia; in the TGA and TGB, after implant placement in the left tibia, the animals were exposed for 3h and 1h/day to PEMF, respectively, until the subgroups were euthanized. The pieces were separated and prepared without decalcification for the histomorphometric analysis that will be performed using the Image J software (NIH Image J 1.34) of the parameters: percentage of bone-implant contact (BIC); and bone area fraction occupied (BAFO). Data were tabulated and appropriate statistical tests were applied, with a significance level of 5%. **Results:** they revealed, in the intergroup evaluation of the BIC, that in 03 days there was a greater amount of bone in contact with the implant in the TGA and TGB groups compared to the CG ($p=0.044$ and 0.017 , respectively). In 07 days, the TGB had a higher BIC compared to the CG ($p=0.017$). In the other periods there were no intergroup differences for this histomorphometric parameter. In the BAFO intergroup evaluation, it was found that there were no statistical differences in any of the periods evaluated. **Conclusion:** the use of PEMF as a biostimulator for the osseointegration process showed a greater amount of bone in contact with the implant in the TGA and TGB groups compared to the CG in the initial periods of the study.

Keywords: electromagnetic fields; osseointegration; rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Distribuição da amostra.....	14
2.2 Procedimento cirúrgico para instalação do implante osseointegrado	15
2.3 Exposição ao CEMP	17
2.4 Eutanásia dos animais.....	18
2.5 Confeção das lâminas histológicas	18
2.6 Captura das imagens e análise histomorfométrica	20
2.6.1 Detalhamento da metodologia para obtenção da BIC	22
2.6.2 Detalhamento da metodologia para obtenção do BAFO	22
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS	26
4 DISCUSSÃO	28
5 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE	38
ANEXO	50

1 INTRODUÇÃO

Há mais de quatro décadas a terapia com implantes osseointegrados tem sido utilizada e desde então inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro* foram publicados, evidenciando sua previsibilidade e segurança na aplicação clínica [1-3]. Inicialmente, seu uso ficou restrito à reabilitação de pacientes com arcada mandibular totalmente edêntula, associado a prótese total superior mucossuportada, o chamado protocolo de Brånemark [4,5]. Posteriormente, a técnica foi sendo expandida também para a reabilitação de pacientes desdentados parciais e para casos unitários [5,6].

O uso de implantes dentários na reabilitação oral tem sido aprimorado a cada dia, visando a melhoria nos resultados estéticos e funcionais, diminuindo o tempo para a conclusão dos casos e aumentando o índice de sucesso a longo prazo [7,8]. Entre os diversos fatores relacionados ao sucesso do tratamento com implantes como: estabilidade mecânica, macroestrutura do implante, protocolo cirúrgico utilizado entre outros fatores, a osseointegração, também denominada de estabilidade secundária, é um dos fatores biológicos de maior peso para o êxito da terapia a longo prazo [9,10].

Os estudos realizados por Brånemark, nas décadas de 50 e 60 sobre a microcirculação óssea, caracterizou o titânio como material capaz de sofrer osseointegração [9,11,12]. O termo osseointegração refere ao contato direto entre o tecido ósseo e a superfície do titânio, sendo capaz de receber cargas funcionais sem que haja movimento relativo progressivo entre eles. Portanto não deve haver tecido conjuntivo ou qualquer tecido não-ósseo na interface osso-implante à nível de microscopia óptica, pois os implantes requerem uma fixação física (estabilidade primária) e biológica (estabilidade secundária) por aposição óssea, com contato direto entre osso e o metal [10,13,14].

A osseointegração é um processo complexo envolvendo diversos mecanismos celulares e moleculares que desencadeiam a ativação das sequências osteogênica, vascular e imunológica, constituindo as fases da osseointegração [15-18]. Estudos demonstram que a cicatrização óssea em torno do implante é um processo lento que demora entre 3 e 6 meses, tanto em humanos quanto nos modelos animais [19-21].

Na busca pela otimização da osseointegração, diversas metodologias têm sido descritas na literatura, dentre elas o uso de terapias adjuvantes na biomodulação óssea peri-implantar. Essas terapias visam aumentar a vascularização sanguínea, regular a expressão dos genes de proteínas estruturais da matriz extracelular e consequentemente acelerar o processo de regeneração óssea, resultando na formação de um osso de melhor qualidade para a instalação do implante, ou seja, de maior densidade e melhor estabilização do implante [22-24].

O uso de estímulos físicos, tais como ultrassom, terapia com laser de baixa potência e o campo eletromagnético, para promover cicatrização de fraturas, reparo de feridas e de diferenciação tecidual na interface osso-implante [25-27] se baseia no fato de que o osso é um material piezoelétrico, que gera polarização quando deformado e transforma a energia mecânica em energia elétrica [28]. A piezoeletricidade vêm sendo apontada como responsável no controle do reparo e remodelação óssea por meio da movimentação do fluido extracelular que transporta íons da matriz óssea, o que valida a capacidade do campo eletromagnético (CEM) em permear o plasma e as membranas celulares [29-33]. Estudos mostraram ainda a capacidade dos CEM em regular a expressão dos genes de proteínas estruturais da matriz extracelular, resultando em aceleração do reparo ósseo [34-36].

Segundo Funk et al. [37], o CEM atua diretamente nas organelas celulares [35], influenciando reações químicas e bioquímicas nas células [37,38]. A penetração do CEM ocasiona o aumento e redução nos fluxos iônicos gerando corrente elétrica [39,40] e alteração do potencial de membrana, tornando-a permeável, especialmente para o íon cálcio (Ca^{2+}), importante sinalizador intracelular [41-43] na indução da diferenciação celular em osteoblastos [32,33,42,44,45]. Portanto, o CEMP influencia as correntes moleculares, levando a sinalização transmembrana específica que promove a diferenciação osteogênica [42,46,47] a partir da estimulação da síntese de proteínas da matriz extracelular óssea [43,48].

Os relatos de Fukada et al. [49] impulsionaram os estudos *in vivo* e *in vitro* na busca de explicações para o efeito de corrente elétrica no reparo ósseo, surgiram ideias que estimulação elétrica fraca, aplicada de forma exógena, poderia agir como estímulo para o osso. Assim, a estimulação elétrica surgiu como uma forma de reparar fraturas ósseas sem a necessidade de cirurgia.

A aplicação do campo eletromagnético pulsado (CEMP) em tecido ósseo com implante osseointegrado é uma terapia não invasiva e que, em muitos estudos *in vivo*, mostrou-se efetiva na aposição óssea direta na superfície do implante [7,26], na osseointegração com aumento no grau de mineralização e maturação óssea [50,51], e no aumento da fixação mecânica [25].

Ainda com a utilização do CEMP, estudos observaram um aumento na quantidade de osso neoformado em menor tempo ao redor de implantes colocados imediatamente após a exodontia [52,20].

Entretanto a literatura também revela que terapia com a aplicação do CEMP no tecido ósseo, não resultou em melhora significativa do processo de osseointegração [53,54] e na cicatrização óssea [19] entre os grupos tratados e controle *in vivo*, uma vez que, o campo eletromagnético não afeta o *turnover* ósseo nas trabéculas ósseas pré-existentes [20].

A variabilidade de protocolos de tratamento do CEMP nos resultados *in vitro* e *in vivo* na osseointegração dos trabalhos disponíveis na literatura, especialmente em relação à duração de sua aplicação no tecido ósseo [7,10,19,26,28,55] também dificulta uma melhor interpretação dos resultados.

Dessa maneira, torna-se importante verificar a possibilidade de um protocolo de utilização do CEMP que aborde parâmetros ideais para sua utilização na Odontologia, principalmente na otimização do processo da osseointegração de implantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo faz parte do trabalho “EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO PULSADO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES INSERIDOS EM TÍBIAS DE RATOS: estudo *in vivo* e *in vitro*”, projeto de doutorado da aluna Camilla Magnoni Moretto Nunes, sob orientação da Prof.^a Dra. Maria Aparecida Neves Jardim, o qual foi submetido ao Comitê de Ética em animais (CEUA) e aprovado com protocolo n0-17/2016, CEUA/ICT CJSC - UNESP.

2.1 Distribuição da amostra

Foram utilizados 60 ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*), com 90 dias de idade e pesando em média 300g, obtidos do biotério da UNESP, campus de Botucatu. Os animais foram randomizados em 3 grupos experimentais, segundo uma tabela gerada em computador: grupo controle (GC, n=20), grupo teste A (GTA, n=20) e grupo teste B (GTB, n=20). Todos os grupos apresentaram 4 subgrupos referentes aos períodos de eutanásia de 03, 07, 21 e 45 dias). Todos os animais receberam a instalação do implante na tíbia esquerda, porém apenas os dos grupos testes (GTA e GTB) receberam aplicação do CEMP. Os animais do GTA e GTB foram expostos por 3h e 1h/dia (por 5 dias na semana), respectivamente, ao CEMP até o período de eutanásia dos subgrupos (Figura 1).

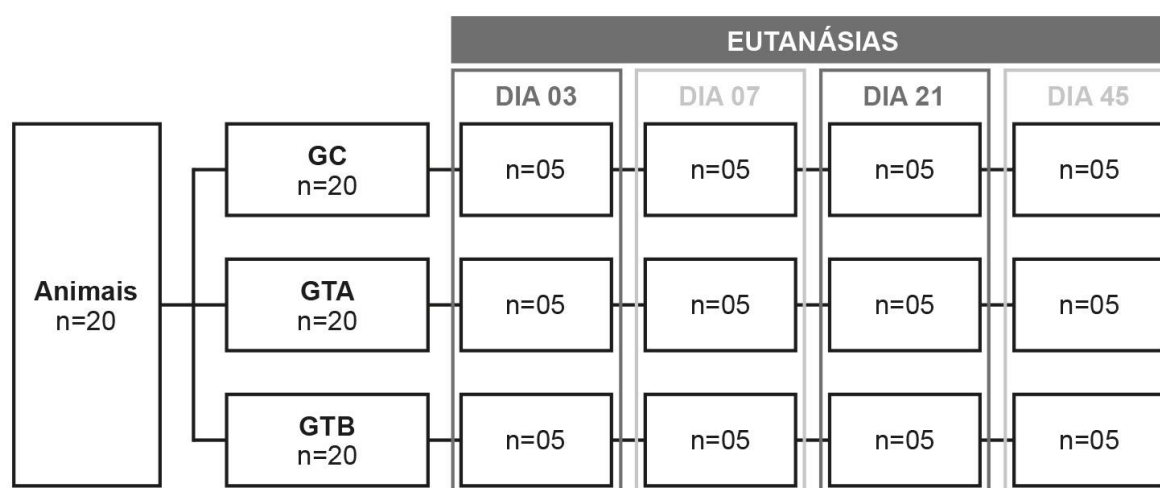


Figura 1 - Randomização dos animais em grupos e subgrupos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O ensaio teve duração de 60 dias no total, divididos em 5 períodos experimentais e 1 de adaptação dos animais (Figura 2). A adaptação dos animais ao biotério foi de 15 dias, e após esse período os animais de cada grupo foram submetidos à instalação de um implante na tíbia esquerda.

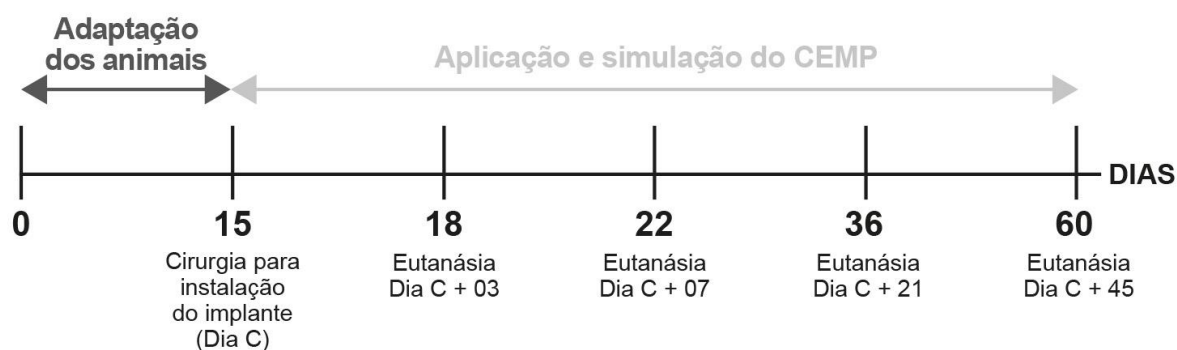


Figura 2 – Fluxograma dos procedimentos experimentais.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os animais operados foram sendo expostos ao CEMP (n=5 animais por vez), de acordo com o grupo experimental (GTA e GTB) até a realização da eutanásia (subgrupos 3, 7, 21 e 45 dias); ou simulado sua exposição ao CEMP (GC). Esses períodos experimentais foram estabelecidos para avaliar o efeito da aplicação do CEMP nas fases iniciais e tardias da osseointegração, através dos parâmetros histomorfométricos BIC e BAFO [7,16].

2.2 Procedimento cirúrgico para instalação do implante osseointegrado

Após realizar a anestesia geral utilizando a solução de 13 mg/Kg de cloridrato de 2- (2,6-xilidino) -5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum - Bayer® do Brasil), associado ao relaxante muscular 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands® do Brasil) aplicado por via intramuscular, os animais foram tricotomizados na região interna da pata esquerda e desinfecionada a região com digluconato de clorexidina a 0,2%.

O procedimento cirúrgico de colocação do implante foi baseado no trabalho de Molon et al. [56] que consistiu em uma incisão de 2 cm na região interna da porção posterior da pata, logo abaixo do joelho, para a exposição da metáfise da tíbia, seguida de divulsão do tecido muscular, osteotomia com auxílio de brocas e

irrigação com solução salina estéril para então realizar a instalação do implante.

Os implantes utilizados no trabalho foram de titânio puro, de superfície usinada, osseointegrável, rosqueável, com 4,0 mm de comprimento por 2,2 mm de diâmetro (Titanium Fix, AS Technology Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) e foram instalados na pata esquerda de todos os animais, a 7 mm da junção do joelho, até que todas as roscas do parafuso estivessem inteiramente inseridas no osso cortical.

O tecido muscular foi suturado com fios de sutura reabsorvíveis (Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) e a pele com fio de seda 4.0 (Ethicon Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). Os animais receberam, imediatamente após a cirurgia, uma dose única de Ketoprofen 10mg/kg por via subcutânea para o controle de dor pós-operatória (Figura 3).

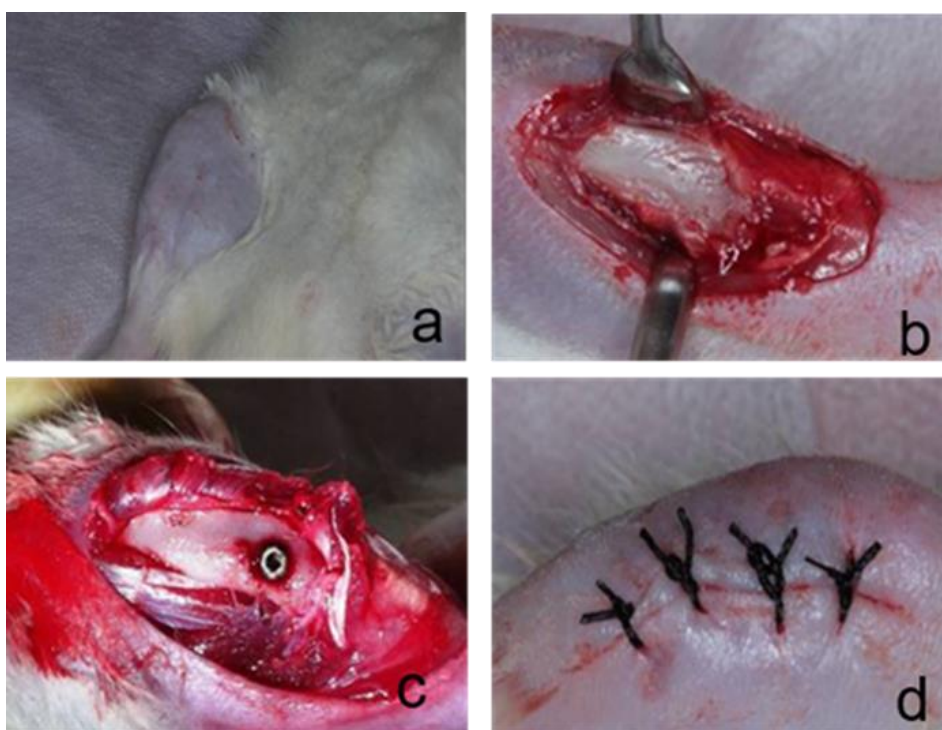


Figura 3 - a) tricotomia, b) divulsão do tecido muscular, c) implante de titânio inserido na tíbia, d) sutura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3 Exposição ao CEMP

Para realizar a exposição dos animais ao campo eletromagnético pulsado (CEMP) foi utilizado um dispositivo composto por um gerador de corrente elétrica pulsátil e a bobina de Helmholtz, utilizada para gerar o campo eletromagnético (Figura 4). Os ratos dos grupos testes (A e B) foram submetidos à exposição do CEMP com os seguintes parâmetros fixos: 25 ciclos de -1mTesla a + 1mTesla em 200 microssegundos que se repetiu a taxa de 15 Hz.

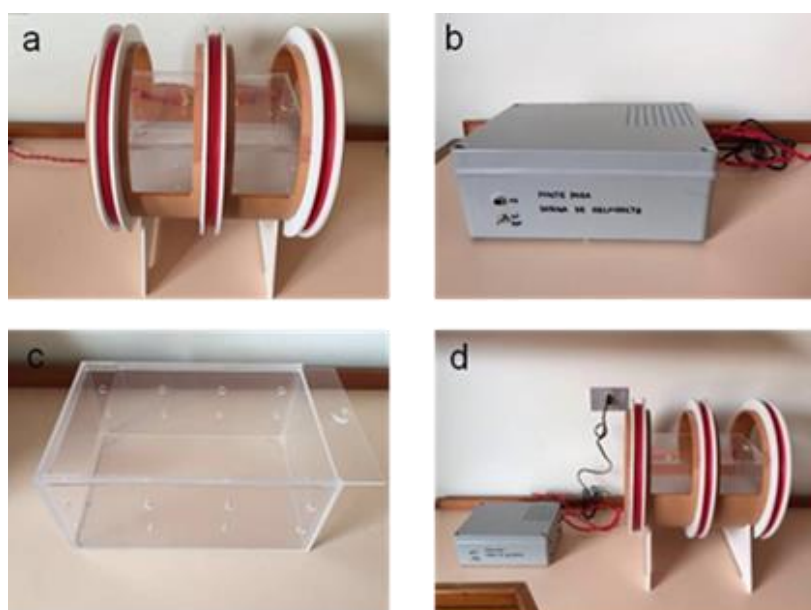


Figura 4 - a) bobinas de Helmholtz; b) fonte de energia; c) caixa acrílica para acondicionamento dos animais; d) conjunto formado pelas bobinas, fonte e caixa acrílica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O GTA ficou exposto ao CEMP por 3 horas ao dia [57], enquanto a exposição do GTB foi de 1 hora ao dia, ambos por 5 dias da semana, até chegar o período para a realização da eutanásia dos subgrupos [58,59].

Na gaiola foram colocados os 5 animais de cada subgrupo dos grupos teste, e posicionada bem no centro do campo eletromagnético gerado pelas bobinas de Helmholtz. Os animais dos subgrupos do CG também foram colocados na gaiola e posicionados no centro do CEMP, porém o dispositivo não foi ligado. Esse

procedimento foi realizado com a intenção apenas de simular a estimulação sofrida pelos animais dos grupos testes [60].

2.4 Eutanásia dos animais

A eutanásia foi sendo realizada de acordo com cada período estabelecido dos subgrupos (3, 7, 21 e 45 dias). Utilizou-se solução anestésica em alta dosagem para realizar o procedimento de eutanásia, em seguida foram removidas as tíbias da pata esquerda de todos os animais e armazenadas em formol a 10% tamponado, por 48 horas, para o processo de fixação das peças.

2.5 Confecção das lâminas histológicas

As peças foram lavadas em água corrente por aproximadamente 15 minutos e depois desidratadas em concentrações crescentes de álcool (Álcool 80%; Álcool 90% e Álcool absoluto). Em seguida, as peças foram imersas no xilol 98%, onde permaneceram durante 24 horas. Após esse período, foram removidas e imersas novamente em uma nova solução de xilol por mais 48 horas, etapa necessária para a clarificação da peça (diafanização).

Finalizado o período de 48h no xilol, as peças foram então transferidas para a solução A, composta por 85mL de metilmetacrilato e 15mL de dibutilftalato (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) onde permaneceu imersa por 4 dias. No quinto dia, as peças foram removidas da solução A e imersas na solução B, composta pela solução A e 1g de peróxido de benzoíla (VETEC química, Rio de Janeiro, Brasil). Na solução B, as peças foram imersas e mantidas em geladeira por 4 dias. Esse procedimento foi realizado para a impregnação das peças.

Para a inclusão, foi feita uma nova solução A acrescida de 3g de peróxido de benzoíla e, em pequenos vidros âmbar (6x4 mm), foi colocada uma pré-base desta mistura. Em seguida, as peças foram coladas nesta pré-base com cola instantânea (Super Bonder®, Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil) e a solução foi vertida sobre o conjunto, dentro do vidro, até que ultrapassasse 1 cm da peça. O vidro foi então tampado (figura 3-A) e colocado na estufa (37°C) até que a solução tomasse

presa e então realizou-se a quebra do vido e o bloco obtido foi cortado no aparelho Labcut (Labcut® 1010 – Extec, Erios, Enfield, Connecticut, Estados Unidos) com disco de corte diamantado (Buehler® IsoMet® Chicago, Illinois, Estados Unidos) e realizado o polimento dos cortes com uma suspensão de polimento (Extec® colloidal sílica- Erios, Enfield, Connecticut, Estados Unidos) em um disco de feltro na politriz (Labpol® 8-12 Extec, Erios, Enfield, Connecticut, Estados Unidos). Os cortes, devidamente polidos foram colados em lâminas histológicas de plaxiglass com cola instantânea de cianoacrilato (Super Bonder®, Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil) e prensados com uma prensa manual. Em seguida, os cortes foram desgastados em uma politriz (Labpol® 8-12 Extec, Erios, Enfield, Connecticut, Estados Unidos), usando lixas d'água (800 a 1200), até que atingissem uma espessura de aproximadamente 0,25 mm, sendo suficiente para visualização de estruturas em microscópio de luz. As lâminas foram então novamente polidas e coradas com azul de toluidina 2%, armazenadas em estufa 37°C por 20 minutos e lavadas em água corrente. Ao final do processamento, foram capturadas as imagens histológicas para análises histomorfométricas (Figura 5).

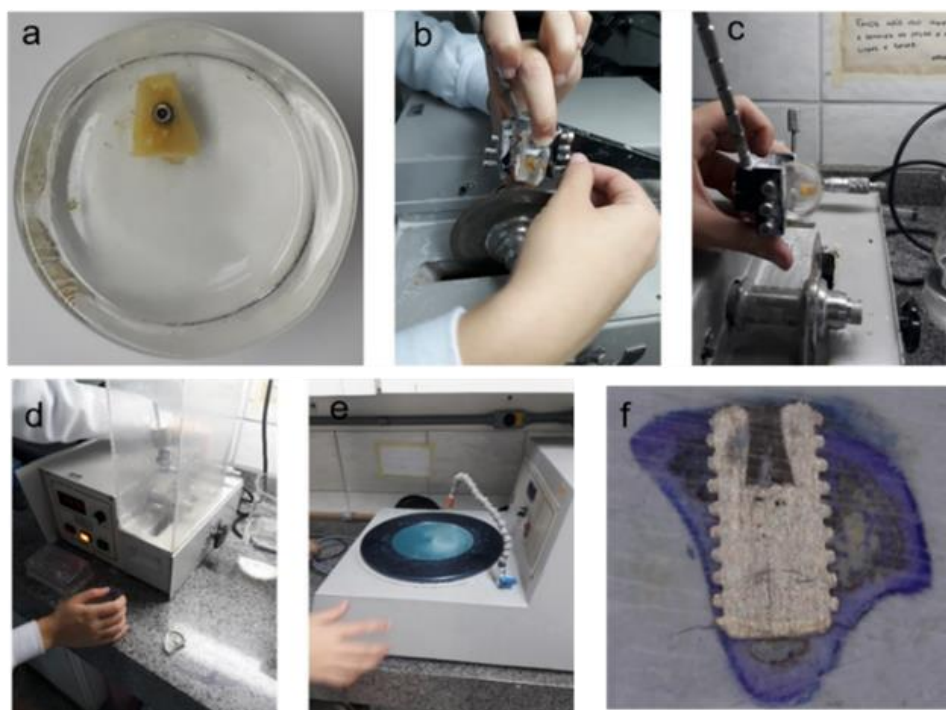


Figura 5 - Imagens da confecção das lâminas. a) peça incluída em resina, b e c) posicionamento na Labcut, d) corte sendo realizado, e) desgaste do fragmento e f) lâmina para a análise.

Fonte: Elaborado pelo autora.

2.6 Captura das imagens e análise histomorfométrica

As imagens obtidas através da análise microscópica foram feitas pela captura de imagens das lâminas a partir do microscópio de luz Axiophot® 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a câmera digital AxioCam MRc® 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) e com transmissão para o programa computacional AxioVision® Release 4.7.2. Foram obtidas duas capturas de imagem da lâmina (lado direito e esquerdo do implante) para a análise histomorfométrica (Figura 6).

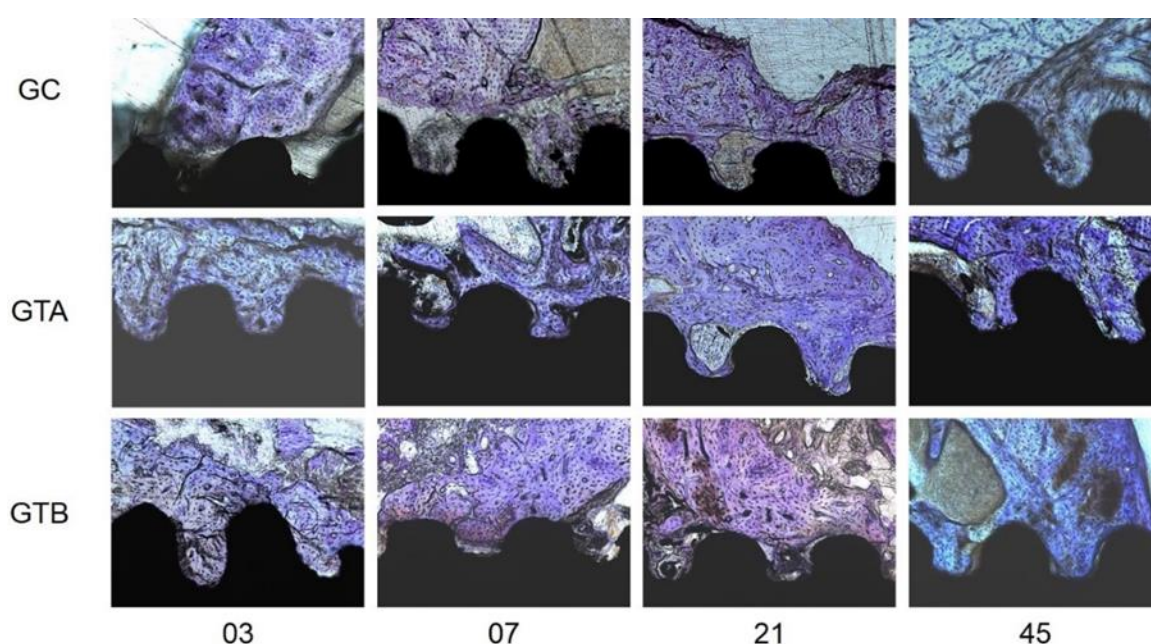


Figura 6 - Figura representativa de um dos lados das lâminas histológicas utilizadas para a avaliação histomorfométrica de BIC e BAFO. Aumento de 100x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa computacional NIH Image J 1.34 (National Institutes of Health, Bethesda, Estados Unidos), de domínio público e os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística.

Com o objetivo de avaliar a osseointegração do implante, foram analisadas duas variáveis histomorfométricas: a extensão linear do tecido ósseo em contato

com as espiras do implante (bone implant contact - BIC) nas regiões mesial e distal da tíbia e a porcentagem de área entre as espiras ocupadas por tecido ósseo (bone area fraction occupied - BAFO) [56]. Para as análises foram selecionadas as duas regiões mais centrais e calibração da régua de aumento (100x1) com um scale de 1848 pixels/ μm , estabelecendo-se assim uma padronização (Figura 7).

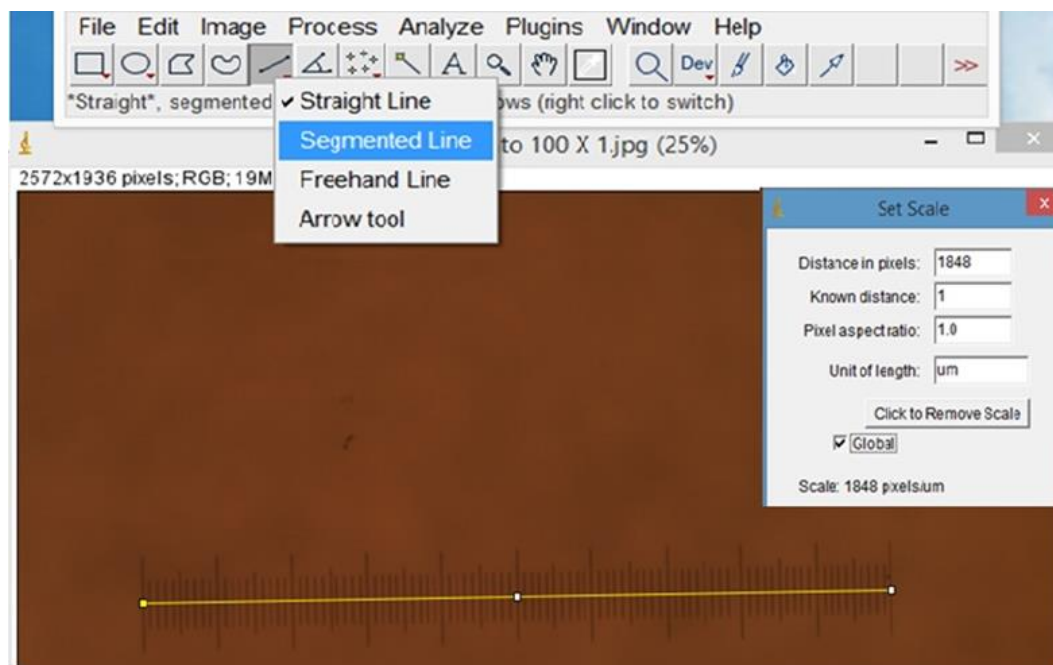


Figura 7 - Tela do software Image J, com calibração da régua de aumento e escala.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o cálculo da BIC foi analisada a extensão linear do tecido ósseo em contato com o implante entre as espiras do implante nas regiões mesial e distal da tíbia e realizada a porcentagem de BIC através do cálculo da extensão linear das espiras analisadas pela extensão linear de contato osso-implante.

O BAFO foi calculado obtendo previamente a área total das espiras avaliadas e a área ocupada por um espaço ou ausência óssea, e depois determinada a porcentagem da área total de espiras ocupadas por tecido ósseo.

2.6.1 Detalhamento da metodologia para obtenção da BIC

Para determinar a BIC, as imagens obtidas, através do escaneamento das lâminas (Panoramic Desk 3D – Histech, Ltd.), foram exportadas para o *software* e com auxílio da ferramenta “*segmente line*” foi contornado todo tecido ósseo que se encontrava em íntimo contato com a espira do implante. No trabalho, foi usado como base as duas espiras mais centrais, assim foi realizado a leitura de 2 cristas e 1 vale. Após determinado o contorno, foi realizada com a ferramenta “*Measure*”, a obtenção dos valores de “*length*” – a medida linear em μm . Calculado os “*length*”, os mesmos foram tabulados e posteriormente realizada a soma das quantidades de *length* de cada imagem, para obter a BIC correspondente a cada lâmina (Figura 8).

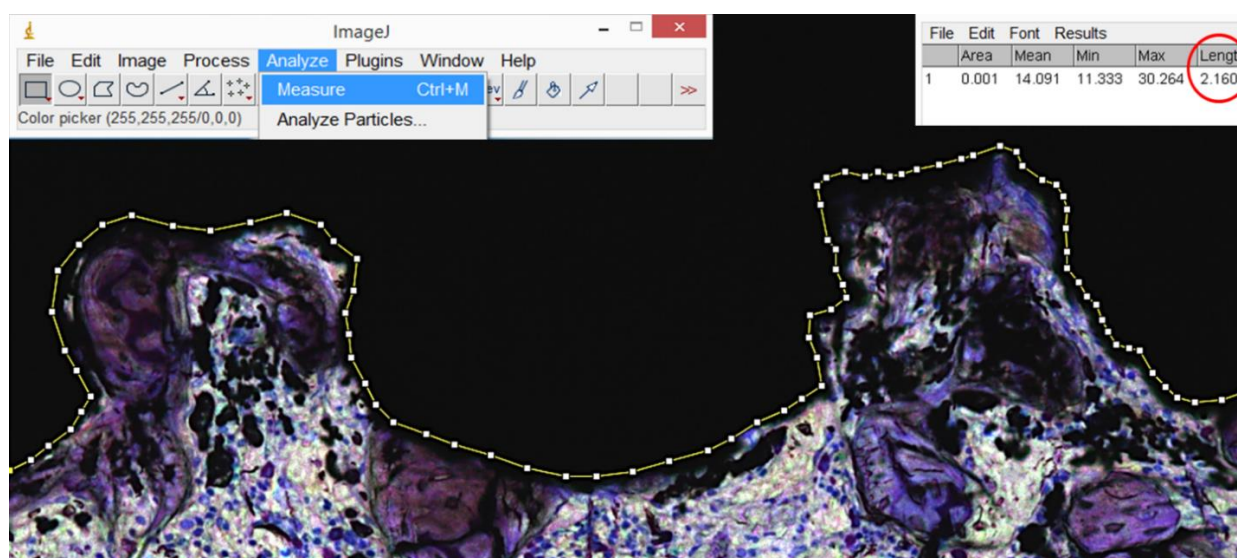


Figura 8: Tela do software Image J, exibindo a ferramenta “Analyze” e “Measure”, que foi utilizada para determinar a BIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.6.2 Detalhamento da metodologia para obtenção do BAFO

Para determinar o BAFO, as imagens obtidas, através do escaneamento das lâminas (Panoramic Desk 3D – Histech, Ltd.), foram exportadas para o *software* e com auxílio da ferramenta “*polygon*” foi contornada a primeira espira em sua totalidade. Após selecionar todo o contorno da primeira espira, foi realizada com a ferramenta “*Measure*”, a obtenção do valor da “*area*”, que corresponde ao valor da área total da primeira espira, esse valor foi tabulado. Após a determinação da área total, foi obtido o valor da área de fração óssea presente na primeira espira. Com auxílio da ferramenta “*polygon*” foi contornada toda a fração óssea presente na primeira espira, tanto a fração que se encontrava em contato ou não com a superfície do implante, e com auxílio da ferramenta “*Measure*”, obtivemos o valor da “*area*”, que corresponde ao valor da área ocupada pela fração óssea da primeira espira, e esse valor foi tabulado. Para a determinação do BAFO dividimos o valor da área de fração óssea dividido pelo valor da área total da espira. As medições também foram realizadas para a segunda espira e com os valores obtidos devidamente tabulados, foi determinado os valores de BAFO para cada espira (Figura 9).

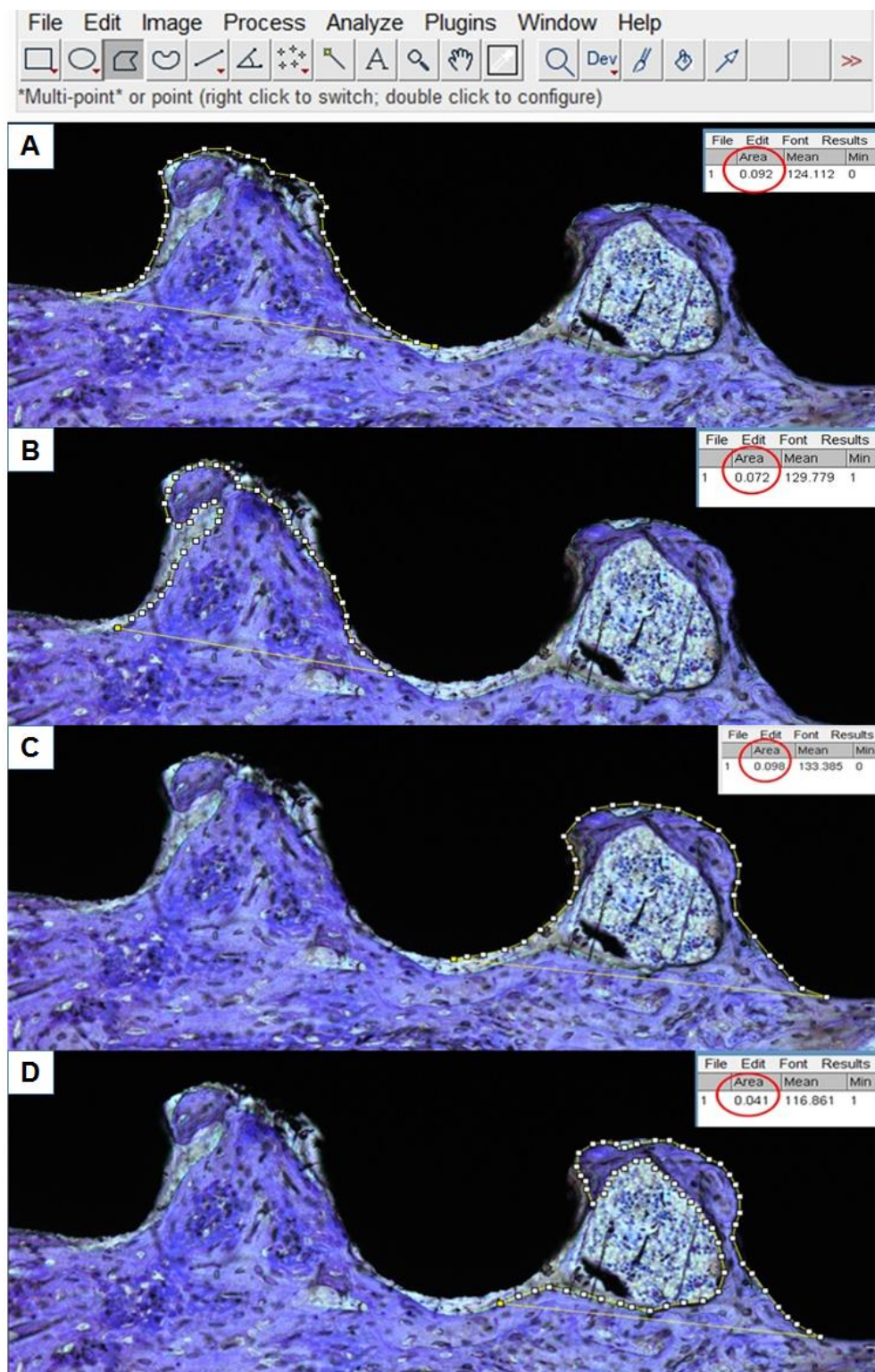


Figura 9 - Tela do software Image J exibindo: **A)** contorno da área total da primeira espira; **B)** contorno da fração óssea da primeira espira; **C)** contorno da área total da segunda espira; **D)** contorno da fração óssea da segunda espira.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi realizado a partir das variáveis BIC e BAFO, utilizando valores de média e desvio padrão obtidos na literatura [7,20,51]. Para um poder maior que 80% seria necessária uma amostra mínima de 42 animais, foram utilizados 60.

Após realizada a análise, os resultados foram submetidos à análise estatística através dos programas computacionais: MINITAB (Minitab®, version 18.1, 2017) e GraphPad Prism (version 7, GraphPad® Software, La Jolla, California, Estados Unidos).

A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão e a estatística inferencial foi realizada primeiramente através do teste de Shapiro-Wilk, para a verificação da normalidade dos dados, seguido pela análise de variância (ANOVA) dois fatores e teste de Tukey Post hoc para as comparações múltiplas, ambos com nível de significância convencional de 5%, para avaliar o efeito dos níveis de tratamento em relação aos períodos de eutanásia.

4 RESULTADOS

Na avaliação intergrupos da BIC, os dados revelaram que em 03 dias houve maior quantidade de osso em contato com o implante nos grupos GTA e GTB em comparação ao GC ($p=0.044$ e 0.017 , respectivamente). Em 07 dias, o GTB apresentou maior BIC em comparação ao GC ($p=0.017$). Nos demais períodos não houve diferenças intergrupos para este parâmetro histomorfométrico (Figura 10).

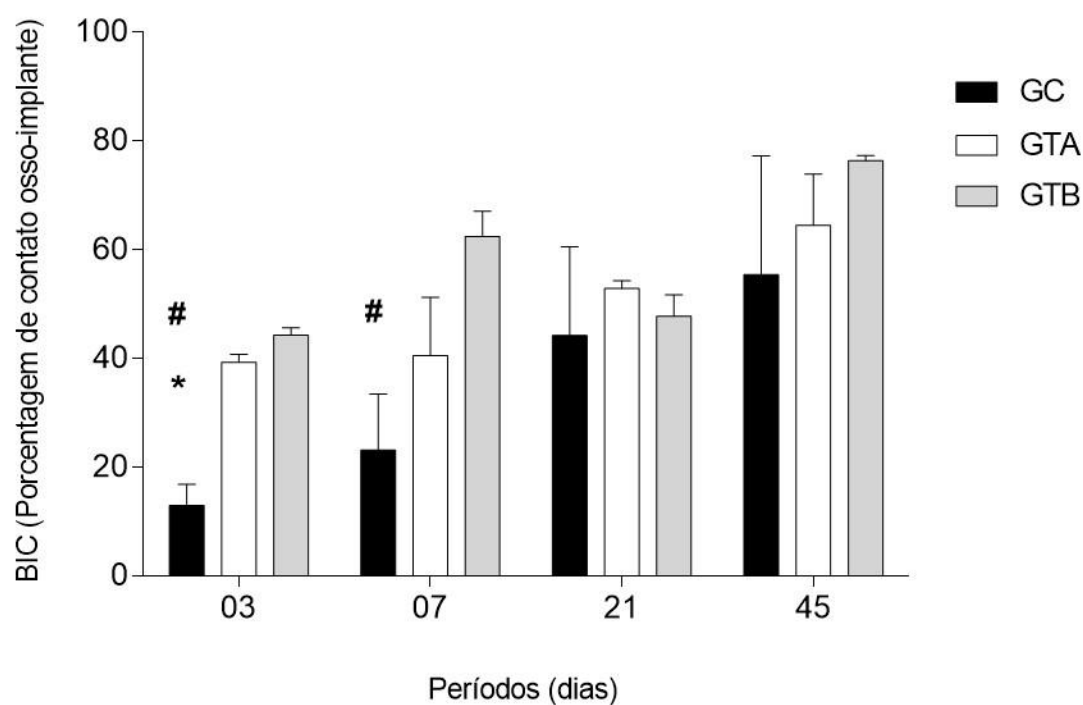


Figura 10 – Gráfico da comparação intergrupos de BIC
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na avaliação intergrupos da área de fração óssea nas espiras (BAFO) constatou-se que não houve diferenças estatística em nenhum dos períodos avaliados (Figura 11).

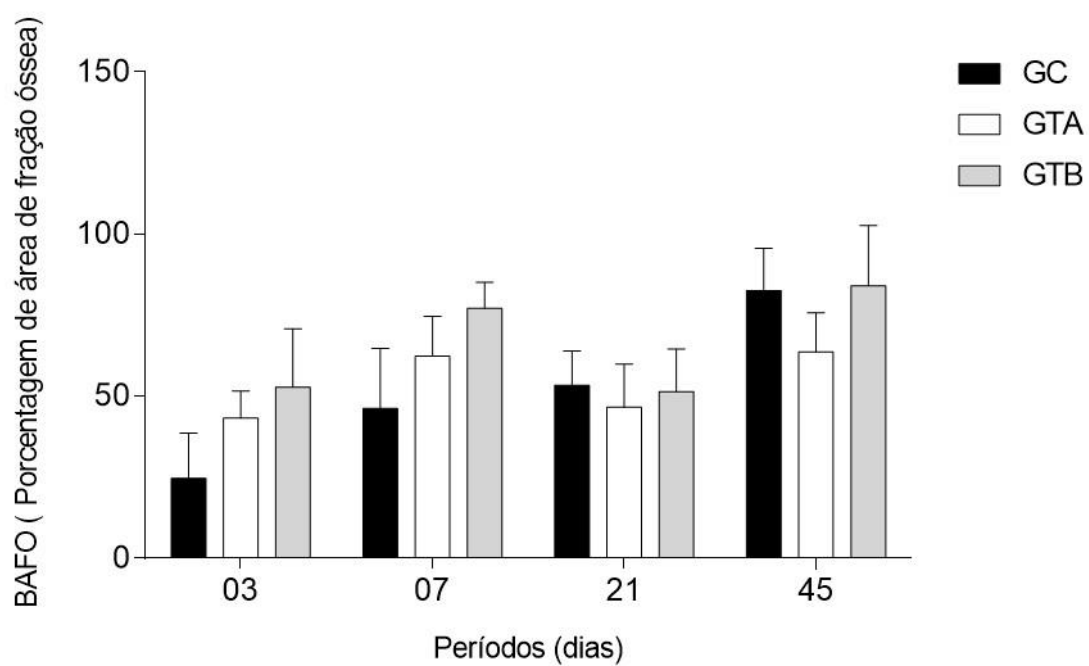


Figura 11 – Gráfico da comparação intergrupos de BAFO
Fonte: Elaborado pelo autor.

4 DISCUSSÃO

Atualmente, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de analisar os efeitos biológicos do CEMP [61] sob diferentes parâmetros (formas de onda, frequência e intensidade), em diferentes tecidos e situações clínicas diversas [36,47,48], porém não há um consenso de quais seriam os parâmetros ideais para a aplicação do CEMP na otimização da osseointegração.

Sabendo da importância da compreensão da interação do CEMP com a osseointegração, este estudo avaliou, através de análises histomorfométricas, a hipótese de que a utilização do CEMP como terapia adjuvante otimizaria o processo de osseointegração de implantes de titânio. Para tanto, foram utilizados como parâmetros do CEMP valores evidenciados na literatura como sendo responsáveis pelo aumento da diferenciação osteogênica *in vitro* [32,53,61-63], que são: 15 Hz de frequência e ± 1 mT para a força do campo eletromagnético.

Os parâmetros de BIC e BAFO foram utilizados na avaliação dos dados obtidos da análise histomorfométrica, por se tratar de medidas consolidadas na literatura para avaliação da osseointegração.

Ao analisar os resultados encontrados neste estudo, observamos que não houve diferença quanto a otimização da osseointegração entre os grupos expostos ao CEMP (grupos GTA e GTB) quando utilizado o parâmetro de BIC para a avaliação. Com tudo, esses grupos se mostraram superiores quando comparados ao grupo controle (GC) e foi observado maior valor de BIC na comparação do GTB e GC nos períodos iniciais da cicatrização óssea. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Jing et al. [51], no qual é observado que a aplicação do CEMP (na frequência de 15 Hz e de 2 mT de força do campo eletromagnético) promoveu maiores valores para BIC e para BAFO quando comparamos os grupos expostos ao CEMP e o controle. No entanto, apesar do CEMP promover maior quantidade de BAFO quando comparado ao GC nos períodos iniciais, os resultados encontrados neste estudo não revelaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

A pesquisa desenvolvida pelo grupo de Barak et al. [20], que utilizou como parâmetros do CEMP de 10 Hz de frequência e 0,2 e 0,4 mT de força do campo eletromagnético, revelou um aumento no valor de BIC apenas em 14 dias de

avaliação, o que diferiu do nosso estudo em que, a partir do terceiro dia, já foi possível notar o aumento deste parâmetro nos grupos expostos ao CEMP em comparação ao GC.

Quando comparamos os resultados dos estudos de Matsumoto et al. [7], Özen et al. [64] e Akca et al. [26], que utilizaram como parâmetros do CEMP 100 Hz de frequência, por 4 horas diárias e 0,2 mT de força do campo eletromagnético, observamos que após 14 dias de exposição ao CEMP é observado um aumento significativo nos valores de BIC e BAFO quando comparados ao GC, sendo que os resultados encontrados para BIC são semelhantes aos observados no presente estudo. Essa diferença observada entre BIC e BAFO pode ser justificada pela dificuldade do coágulo em preencher toda a área de cicatrização, ou seja, o espaço existente entre a parede óssea do leito receptor e as espiras do implante, o que leva a um comprometimento na formação óssea próxima ao centro do implante [65], que pode ser consequência do tipo de protocolo de perfuração utilizada que, de acordo com Baires-Campos et al. [66], resulta em diferentes respostas biológicas com valores mais altos de BIC e BAFO para perfurações intermediárias [67]. Outro ponto relevante é que estudos relatam que o CEMP não afeta o turnover ósseo de trabéculas ósseas pré existentes. Portanto, no período inicial do reparo ósseo a diferenciação osteogênica é maior, levando um aumento do número de trabéculas ósseas. Após esse período inicial já existe um número muito grande de trabéculas ósseas, que não serão afetadas pelo CEMP [20].

Segundo Soares et al. [67], fatores como, o design do implante, as dimensões da área de cicatrização e o tipo de osso, são fatores que também influenciam no processo de osseointegração, resultando em diferentes respostas biológicas que influenciam as medidas histomorfométricas.

Respeitando as limitações técnicas e o modelo de estudo utilizado, o presente estudo alcançou resultados satisfatórios na otimização da cicatrização óssea em ensaios pré-clínicos, contribuindo assim para a validação do uso do CEMP como uma terapia coadjuvante à instalação de implantes, além de favorecer outras pesquisas para o melhor entendimento dos mecanismos de ação no reparo ósseo.

5 CONCLUSÃO

A utilização do CEMP como um bioestimulador para o processo de osseointegração mostrou um aumento na quantidade de osso em contato com o implante nos grupos GTA e GTB quando comparados ao GC nos períodos iniciais do estudo (3 e 7 dias) e por menor tempo de exposição (1h diária).

REFERÊNCIAS

1. Bell CL, Diehl D, Bell BM, Bell RE. The Immediate Placement of Dental Implants Into Extraction Sites With Periapical Lesions: A Retrospective Chart Review. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Jun;69(6):1623-7. doi: 10.1016/j.joms.2011.01.022. Epub 2011 Apr 15.
2. Karthikeyan I, Desai SR, Singh R. Short implants: A systematic review. *J Indian Soc Periodontol*. 2012;16(3):302-12. doi: 10.4103/0972-124X.100901.
3. Buser D, Janner SF, Wittneben JG, Brägger U, Ramseier CA, Salvi GE. 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Dec;14(6):839-51. doi: 10.1111/j.1708-8208.2012.00456.x. PMID: 22897683
4. Lazzara RJ. Immediate implant placement into extraction sites: surgical and restorative advantages. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1989;9(5):332-43. PMID: 2640210.
5. Jemt T, Carlsson L, Boss A, Jörneús L. In vivo load measurements on osseointegrated implants supporting fixed or removable prostheses: a comparative pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991 Winter;6(4):413-7. PMID: 1820310.
6. Dhanrajani PJ, Al-Rafee MA. Single-tooth implant restorations: a retrospective study. *Implant Dent*. 2005 Jun;14(2):125-30. doi: 10.1097/01.id.0000163806.14351.54. PMID: 15968183.
7. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2000 Aug;11(4):354-60. doi: 10.1034/j.1600-0501.2000.011004354.x. PMID: 11168228.
8. Gahlert M, Roehling S, Sprecher CM, Kniha H, Milz S, Bormann K. In vivo performance of zirconia and titanium implants: a histomorphometric study in mini pig maxillae. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Mar;23(3):281-6. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02157.x. Epub 2011 Aug 2. PMID: 21806681.
9. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132. PMID: 356184.
10. Dimitriou R, Babis GC. Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007 Jul-Sep;7(3):253-65. PMID: 17947809.
11. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70. doi:

10.3109/17453678108991776. PMID: 7246093.

12. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983 Sep;50(3):399-410. doi: 10.1016/s0022-3913(83)80101-2. PMID: 6352924.

13. Kinni ME, Hokama SN, Caputo AA. Force transfer by osseointegration implant devices. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987 Winter;2(1):11-4. PMID: 3552975.

14. Parithimarkalaignan S, Padmanabhan TV. Osseointegration: an update. *J Indian Prosthodont Soc*. 2013 Mar;13(1):2-6. doi: 10.1007/s13191-013-0252-z. Epub 2013 Jan 11. PMID: 24431699; PMCID: PMC3602536.

15. Balbino CA, Pereira, LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005 Mar;41(1);27-51. doi: 10.1590/S1516-93322005000100004>.

16. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol*. 2009 Jul;84(3);257-62. doi: 10.1590/S0365-05962009000300007.

17. Gürgen SG, Sayın O, Cetin F, Tuğ Yücel A. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) accelerates cutaneous wound healing and inhibits pro-inflammatory cytokines. *Inflammation*. 2014 Jun;37(3):775-84. doi: 10.1007/s10753-013-9796-7. PMID: 24357416.

18. Ferroni L, Gardin C, Dolkart O, Salai M, Barak S, Piattelli A, et al. Pulsed electromagnetic fields increase osteogenetic commitment of MSCs via the mTOR pathway in TNF- α mediated inflammatory conditions: an in-vitro study. *Sci Rep*. 2018 Mar 23;8(1):5108. doi: 10.1038/s41598-018-23499-9. PMID: 29572540; PMCID: PMC5865106.

19. Nascimento C, Issa JPM, Mello ASS, Albuquerque Júnior RF. Effects of electromagnetic field on bone regeneration around dental implants after immediate placement in the dog mandible: a pilot study. *Gerontology*. 2012 Jun;29(2):e1249-51. doi: 10.1111/j.1741-2358.2011.00525.x. PubMed PMID: 22612842.

20. Barak S, Neuman M, Iezzi G, Piattelli A, Perrotti V, Gabet Y. A new device for improving dental implants anchorage: a histological and micro-computed tomography study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Aug;27(8):935-42. doi: 10.1111/clr.12661. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26249830.

21. Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol 2000*. 2017 Feb;73(1):22-40. doi: 10.1111/prd.12179. PMID: 28000277.

22. Boyan BD, Schwartz Z, Lohmann CH, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, et al. Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. *J Orthop Res*. 2003 Jul;21(4):638-47. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00261-9. PMID: 12798063.

23. Ebrahimi T, Moslemi N, Rokn A, Heidari M, Nokhbatolfoghahaie H, Fekrazad R.

The influence of low-intensity laser therapy on bone healing. *J Dent (Tehran)*. 2012 Fall;9(4):238-48. Epub 2012 Dec 31. PMID: 23323186; PMCID: PMC3536459.

24. Barbosa D, Villaverde AG, LoschiavoArisawa EA, Souza RA. Laser therapy in bone repair in rats: analysis of bone optical density. *Acta Ortop Bras*. 2014;22(2):71-4. doi: 10.1590/1413-78522014220200438.

25. Fini M, Cadossi R, Cane V, Cavani F, Giavaresi G, Krajewski A, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osseointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. *J Orthop Res*. 2002 Jul;20(4):756-63. PubMed PMID: 12168664.

26. Akca K, Sarac E, Baysal U, Fanuscu M, Chang TL, Cehreli M. Micro-morphologic changes around biophysically-stimulated titanium implants in ovariectomized rats. *Head Face Med*. 2007 Jul 16;3:28. doi: 10.1186/1746-160X-3-28. PMID: 17634134; PMCID: PMC1947957.

27. Grana DR, Marcos HJ, Kokubu GA. Pulsed electromagnetic fields as adjuvant therapy in bone healing and peri-implant bone formation: an experimental study in rats. *Acta Odontol Latinoam*. 2008;21(1):77-83. PMID: 18841750.

28. Lirani AP, Lazaretti-Castro M. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005 Dez;49(6):891-6. doi: 10.1590/S0004-27302005000600006.

29. Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, et al. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res*. 2015 Jul;15(1):96-108. doi: 10.1016/j.scr.2015.04.009. Epub 2015 May 12. Review. PubMed PMID: 26042793.

30. Galli C, Pedrazzi G, Mattioli-Belmonte M, Guizzardi S. The Use of Pulsed Electromagnetic Fields to Promote Bone Responses to Biomaterials In Vitro and In Vivo. *Int J Biomater*. 2018 Sep 3;2018:8935750. doi: 10.1155/2018/8935750. PMID: 30254677; PMCID: PMC6140132.

31. Hastings GW, Mahmud FA. Electrical effects in bone. *J Biomed Eng*. 1988 Nov;10(6):515-21. PubMed PMID: 3070168.

32. Yoshida T, Kim WC, Kubo T. [Bone fracture and the healing mechanisms. Fracture treatment using electrical stimulation]. *Clin Calcium*. 2009 May;19(5):709-17. PMID: 19398840.

33. Massari L, Benazzo F, Falez F, Perugia D, Pietrogrande L, Setti S, Osti R, Vaienti E, Ruosi C, Cadossi R. Biophysical stimulation of bone and cartilage: state of the art and future perspectives. *Int Orthop*. 2019 Mar;43(3):539-551. doi: 10.1007/s00264-018-4274-3. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30645684; PMCID: PMC6399199.

34. Noriega-Luna B, Sabanero M, Sosa M, Avila-Rodriguez M. Influence of pulsed magnetic fields on the morphology of bone cells in early stages of growth. *Micron*. 2011 Aug;42(6):600-7. doi: 10.1016/j.micron.2011.02.005. Epub 2011 Mar 2. PMID:

21474322.

35. Wang J, An Y, Li F, Li D, Jing D, Guo T, et al. The effects of pulsed electromagnetic field on the functions of osteoblasts on implant surfaces with different topographies. *Acta Biomater.* 2014 Feb;10(2):975-85. doi: 10.1016/j.actbio.2013.10.008. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24140610.

36. Jing D, Li F, Jiang M, Cai J, Wu Y, Xie K, et al. Pulsed electromagnetic fields improve bone microstructure and strength in ovariectomized rats through a Wnt/Lrp5/ β -catenin signaling-associated mechanism. *PLoS One.* 2013 Nov 14;8(11):e79377. doi: 10.1371/journal.pone.0079377. PMID: 24244491; PMCID: PMC3828367.

37. Funk RH. Coupling of pulsed electromagnetic fields (PEMF) therapy to molecular grounds of the cell. *Am J Transl Res.* 2018 May 15;10(5):1260-1272. PMID: 29887943; PMCID: PMC5992548.

38. Daish C, Blanchard R, Fox K, Pivonka P, Pirogova E. The Application of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) for Bone Fracture Repair: Past and Perspective Findings. *Ann Biomed Eng.* 2018 Apr;46(4):525-542. doi: 10.1007/s10439-018-1982-1. Epub 2018 Jan 22. PMID: 29356996.

39. Leesungbok R, Ahn SJ, Lee SW, Park GH, Kang JS, Choi JJ. The effects of a static magnetic field on bone formation around a sandblasted, large-grit, acid-etched-treated titanium implant. *J Oral Implant.* 2013 May;39(SPL.ISSUE1):248-55. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-11-00101.

40. Kim EC, Leesungbok R, Lee SW, Hong JY, Ko EJ, Ahn SJ. Effects of static magnetic fields on bone regeneration of implants in the rabbit: micro-CT, histologic, microarray, and real-time PCR analyses. *Clin Oral Implants Res.* 2017 Apr;28(4):396-405. doi: 10.1111/clr.12812. Epub 2016 Mar 11. PubMed PMID: 26972335.

41. Parekh AB. Decoding cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Trends Biochem Sci.* 2011 Feb;36(2):78-87. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.013. Epub 2010 Aug 31. PubMed PMID: 20810284.

42. Tong J, Sun L, Zhu B, Fan Y, Ma X, Yu L, et al. Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients. *Bioelectromagnetics.* 2017 Oct;38(7):541-49. doi: 10.1002/bem.22076. Epub 2017 Aug 18. PubMed PMID: 28833306.

43. Selvamurugan N, He Z, Rifkin D, Dabovic B, Partridge NC. Pulsed electromagnetic field regulates microrna 21 expression to activate $\text{tgf-}\beta$ signaling in human bone marrow stromal cells to enhance osteoblast differentiation. *Stem Cells Int.* 2017;2017:2450327. doi: 10.1155/2017/2450327. Epub 2017 Apr 23. PubMed PMID: 28512472.

44. He Z, Selvamurugan N, Warshaw J, Partridge NC. Pulsed electromagnetic fields inhibit human osteoclast formation and gene expression via osteoblasts. *Bone.* 2018 Jan;106:194-203. doi: 10.1016/j.bone.2017.09.020. PubMed PMID: 28965919.

45. Naito Y, Yamada S, Jinno Y, Arai K, Galli S, Ichikawa T, et al. Bone-forming effect of a static magnetic field in rabbit femurs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2019 Mar/Apr;39(2):259-64. doi: 10.11607/prd.3220. PubMed PMID: 30794262.
46. Jazayeri M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Bolouri B, Mirahmadi F, Farokhi M. Effects of Electromagnetic Stimulation on Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells and Repair of Bone Lesions. *Cell J*. 2017 Apr-Jun;19(1):34-44. Epub 2016 Dec 21. PubMed PMID: 28367415.
47. Suryani L, Too JH, Hassanbhai AM, Wen F, Lin DJ, Yu N, et al. Effects of Electromagnetic Field on Proliferation, Differentiation, and Mineralization of MC3T3 Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2019 Feb;25(2):114-25. doi:10.1089/ten.TEC.2018.0364. PubMed PMID: 30661463.
48. Ehnert S, Falldorf K, Fentz AK, Ziegler P, Schröter S, Freude T, et al. Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure - Clinical implication possible. *Bone Rep*. 2015 Aug 18;3:48-56. doi: 10.1016/j.bonr.2015.08.002. PMID: 28377966.
49. Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan*. 1957;12(10):1158-62. doi:10.1143/JPSJ.12.1158.
50. Grana DR, Marcos HJ, Kokubu GA. Pulsed electromagnetic fields as adjuvant therapy in bone healing and peri-implant bone formation: an experimental study in rats. *Acta Odontol Latinoam*. 2008;21(1):77-83. PMID: 18841750.
51. Jing D, Zhai M, Tong S, Xu F, Cai J, Shen G, et al. Pulsed electromagnetic fields promote osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in bone defect repair through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Sci Rep*. 2016 Aug 24;6:32045. doi:10.1038/srep32045. PMID: 27555216.
52. Shayesteh YS, Eslami B, Dehghan MM, Vaziri H, Alikhassi M, Mangoli A, et al. The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. *J Prosthodont*. 2007 Sep-Oct;16(5):337-42. PubMed PMID: 17559534.
53. Jansen JH, van der Jagt OP, Punt BJ, Verhaar JA, van Leeuwen JP, Weinans H, et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010 Aug 23;11:188. doi: 10.1186/1471-2474-11-188. PubMed PMID: 20731873.
54. Buzzá EP, Shibli JA, Barbeiro RH, Barbosa JR. Effects of electromagnetic field on bone healing around commercially pure titanium surface: histologic and mechanical study in rabbits. *Impl Dent*. 2003;12(2):182-7. PubMed PMID:12861888.
55. Chang WH, Chen LH, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*. 2004 Sep;25(6):457– 65. PubMed PMID: 15300732.
56. de Molon RS, Najarro JA, Morais-Camillo D, Verzola MHA , Faeda RS, Pepato

MT, et al. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin. Oral Impl Res.* 2013 Jul;24(7):831–7 doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02467.x. PubMed PMID: 22509797.

57. McLeod KJ, Rubin CT. The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am.* 1992 Jul;74(6):920-9. Erratum in: *J Bone Joint Surg Am* 1992 Sep;74(8):1274. PubMed PMID: 1634583.

58. Androjna C, Fort B, Zborowski M, Midura RJ. Pulsed electromagnetic field treatment enhances healing callus biomechanical properties in an animal model of osteoporotic fracture. *Bioelectromagnetics.* 2014 Sep;35(6):396-405. doi:10.1002/bem.21855. PubMed PMID: 24764277.

59. Midura RJ, Ibiwoye MO, Powell KA, Sakai Y, Doehring T, Grabiner MD, et al. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. *J Orthop Res.* 2005 Sep;23(5):1035-46. PubMed PMID: 15936919.

60. Tucker JJ, Cirone JM, Morris TR, Nuss CA, Huegel J, Waldorff EI, et al. Pulsed electromagnetic field therapy improves tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model. *J Orthop Res.* 2017 Apr;35(4):902-9. doi: 10.1002/jor.23333. PubMed PMID: 27282093.

61. Schwartz Z, Simon BJ, Duran MA, Barabino G, Chaudhri R, Boyan BD. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2008 Sep;26(9):1250-5. doi: 10.1002/jor.20591. PubMed PMID: 18404656.

62. Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, Konttinen YT. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Jan;9(1):31-40. doi: 10.1002/term.1612. PubMed PMID: 23038647.

63. Galli C, Pedrazzi G, Mattioli-Belmonte M, Guizzardi S. The Use of pulsed electromagnetic fields to promote bone responses to biomaterials in vitro and in vivo. *Int J Biomater.* 2018 Sep 3;2018:8935750. doi: 10.1155/2018/8935750. PubMed PMID: 30254677.

64. Özen J, Atay A, Oruç S, Dalkiz M, Beydemir B, Develi S. Evaluation of pulsed electromagnetic fields on bone healing after implant placement in the rabbit mandibular model. *Turk J Med Sci.* 2004;34(2):91–5.

65. Beutel BG, Danna NR, Granato R, Bonfante EA, Marin C, Tovar N, et al. Implant design and its effects on osseointegration over time within cortical and trabecular bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016 Aug;104(6):1091-7. doi: 10.1002/jbm.b.33463

66. Baires-Campos FE, Jimbo R, Bonfante EA, Fonseca-Oliveira MT, Moura C, ZanettaBarbosa D, et al. Drilling dimension effects in early stages of osseointegration and implant stability in a canine model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20:471-9.

67. Soares PB, Moura CC, Claudino M, Carvalho VF, Rocha FS, Zanetta-Barbosa D. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration: A Histomorphometric and Implant Stability Study in Rabbits. *Braz Dent J.* 2015 Oct;26(5):451-7. doi: 10.1590/0103- 6440201300411.

APÊNDICE A – Artigo Científico publicado no periódico Clinical Oral Implants Research – Qualis CAPES A1 e Fator de Impacto 4,78.

Clinical Oral Investigations (2021) 25:2925–2937
<https://doi.org/10.1007/s00784-020-03612-x>

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of pulsed electromagnetic field protocols in implant osseointegration: in vivo and in vitro study

Camilla Magnoni Moretto Nunes¹ · Camila Lopes Ferreira¹ · Daniella Vicensotto Bernardo¹ ·
 Cássia Carolina Rabelo Lopes¹ · Luma Collino¹ · Victória Clara da Silva Lima¹ · Daphne de Camargo Reis Mello² ·
 Luana Marotta Reis de Vasconcellos² · Maria Aparecida Neves Jardim¹ 

Received: 25 June 2020 / Accepted: 29 September 2020 / Published online: 9 October 2020
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Objectives The present study aims to evaluate two protocols of pulsed electromagnetic field (PEMF) on osseointegration and establish one that addresses ideal parameters for its use in dentistry, especially in the optimization of the implants osseointegration process.

Materials and methods Sixty male rats (Wistar) were allocated into three experimental groups: control (GC), test A (GTA, 3 h exposed), and test B (GTB, 1 h exposed). All animals received titanium implants in both tibias, and PEMF application (15 Hz, ± 1 mT, 5 days/week) occurred only in the test groups. They were euthanized at 03, 07, 21, and 45 days after PEMF therapy. Removal torque, histomorphometric measurements, three-dimensional radiographic evaluation, and in vitro biological assay analyses were performed.

Results GTB showed better results compared with GTA in removal torque tests, in bone volume and bone mineral density, cell viability, total protein content, and mineralization nodules ($p < 0.05$). GTA showed better performance in trabecular bone thickness and cell proliferation compared with GTB ($p < 0.05$), especially at osseointegration early periods. In the histomorphometric analysis and number of trabeculae, there were no differences in the test groups.

Conclusion PEMF as a biostimulator was effective in optimizing the events in bone tissue that lead to osseointegration, especially when applied for a shorter time and in the initial periods of bone healing.

Clinical relevance The PEMF therapy is an effective alternative method for optimizing bone healing.

Keywords Osseointegration · Electromagnetic fields · Bone-anchored implants · Rats

Introduction

It is well-established that titanium implants have excellent mechanical properties and biocompatibility with bone tissue [1–3]. The bone condition of the recipient bed and at the implant interface are factors which affect the primary implant

stability. In addition, the time for functional loading will still be necessary for the most dental implants available, and all these factors are critical in the osseointegration process [2–4], which can consume more time to promote the bone growth in dental biomaterial and orthopedic treatments, especially in systemically compromised patients [4–6].

Optimizing the osseointegration process in prosthetic rehabilitation, adjuvant therapies such as biophysical stimulation have been studied to accelerate and improve bone regeneration [2, 3, 7–9].

Because bone tissue has piezoelectric properties, i.e., it produces electrical polarization when subjected to mechanical deformation, human clinical trials and animal experiments have emerged associating bone repair through the therapeutic use of electricity [7, 10]. Due to its action on various cell types and tissues [9, 11–15], it becomes a safe and non-invasive treatment for various conditions such as ulcers and chronic inflammatory diseases, especially those affecting the bone tissue [7, 9, 11, 16–18].

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00784-020-03612-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Maria Aparecida Neves Jardim
maria.jardini@unesp.br

¹ Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology of São José dos Campos, Av Engenheiro Francisco José Longo, 777, São Dimas, São José dos Campos, São Paulo 12245-000, Brazil

² Department of Bioscience and Bucal Diagnosis, São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology of São José dos Campos, São José dos Campos, Brazil

There are small electrical currents produced from the normal functions of the body's reactions to generate electrically charged particles [19]. Ionic movements can cause membrane potentials changing across the cell membrane generating endogenous electromagnetic fields. The piezoelectricity of bone tissue has been suggested to be responsible for the repair of control and bone remodeling by moving the extracellular fluid that transports ions in the bone matrix [19, 20].

With the exogenous application of pulsed electromagnetic field (PEMF), the intracellular and extracellular mechanisms are activated, demonstrating their ability to permeate plasma and cell membranes [20, 21]. By pulsing the electromagnetic field, the increase causes a reduction in ion fluxes generating electric current [5, 22], and the membrane potential is changed making it permeable, especially for calcium ion (Ca^{2+}), an important intracellular signaling [23, 24] in inducing cell differentiation in osteoblasts [15, 19, 20, 24, 25].

PEMF affects the molecular chains causing specific transmembrane signaling that promotes osteogenic differentiation [24, 26, 27] from the stimulation of protein synthesis of the extracellular bone matrix [9, 23]. Therefore, bone tissue becomes a favorable target for PEMF treatment [19].

The animal experimental model for the bone healing process in preclinical studies has an important role in tissue engineering allowing to evaluate the conditions that affect bone tissue and osseointegration with positive results for PEMF therapy [19].

There are many PEMF treatment protocols in osseointegration studies available in the literature, especially about the duration of its application [10, 28], but due to the variability of available results, it is difficult to choose the best option for the therapy application.

The present study aims to evaluate two protocols of pulsed electromagnetic field (PEMF) at different osseointegration periods and establish one that addresses ideal parameters for its use in dentistry, especially in the optimization of the implant osseointegration process.

Materials and methods

This study was approved by the Animal Studies Review Board of the Institute of Science and Technology, UNESP—Univ. Estadual Paulista, São José dos Campos, Brazil (17/2016)—and followed the ARRIVE guidelines for reporting in vivo animal experiments. Sixty male Wistar (*Rattus norvegicus*, Albinus) rats (weighing 250 to 300 g and 3 months old) were randomly divided into 5 animals per cage and kept at room temperature with a 12-h daylight cycle, fed with GuabiNutrilabor® (Mogiana Alimentos; São Paulo, SP, Brazil) and water ad libitum, supplied by qualified staff, at the animal house of Institute of Science and Technology,

UNESP—Univ. Estadual Paulista, São José dos Campos, throughout the experimental period.

The animals were randomized and allocated into 3 experimental groups according to a computer-generated table: control group (GC; $n = 20$), test A group (GTA; $n = 20$) with exposure to PEMF for 3 h, and test B Group (GTB; $n = 20$) with exposure to PEMF for 1 h. All animals in the three groups received 3 titanium implants in the tibia (2 in the right tibia and 1 in the left tibia). The experiment lasted 60 days divided into 5 intervention periods in which the procedures were performed.

Sample size calculation

The sample size to assure a power test up to 80%, and alpha of 0.05%, in this study was calculated considering differences of 0.5% for bone-implant contact (BIC) between exposed and non-exposed groups to the electromagnetic field and a standard deviation of 0.52% [5]. Based on G*Power (version 3.1.9.2) calculation, it was determined that 5 animals per group would be necessary for this study.

Surgical procedure

For the surgical procedure, the animals were anesthetized by intramuscular injection of xylazine (13 mg/kg—Rompun®, Bayer; São Paulo, SP, Brazil) and ketamine (33 mg/kg—Dopalen®, Agribands do Brasil Ltda; Paulínia, SP, Brazil). The inner region of the left and right paws were trichotomized and disinfected, and a linear incision was performed in the internal region of the posterior portion of the paw, below the knee for exposure of the tibial metaphysis [29].

The muscle tissue disruption and osteotomy were performed with the aid of drills and irrigation with sterile saline solution. In the study, we used 180 pure titanium implants, surface machined, osseointegrated, threaded with 4.0-mm length by 2.2-mm diameter (Titanium Fix®, The Technology Inc., São José dos Campos, SP, Brazil) inserted in both paws of each animal of the experimental groups. In the right paw, the first implant was inserted 7 mm away from the knee joint and the second placed 5 mm distally from the first. In the left paw, an implant was inserted 7 mm from the knee joint until all the screw threads were inside the cortical bone. Muscle tissue was sutured with resorbable sutures (Vicryl Ethicon® 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, SP, Brazil) and skin with 4.0 silk thread (Ethicon® Johnson Prod., São José dos Campos, SP, Brazil).

After surgery, the animals received a single dose of 5 mg/kg of ketoprofen (Laboratório Teuto Brasileiro S.A.; Anápolis, GO, Brazil) by the subcutaneous route for postoperative pain control.

PEMF therapy

The PEMF device was composed of a pulsed signal generator and Helmholtz coils. The rats were subjected to PEMF exposure with the following fixed parameters: 25 cycles of -1 milliTesla to $+1$ milliTesla in $200\ \mu\text{s}$ repeated at $15\ \text{Hz}$. The exposure to PEMF in GTA was $3\ \text{h}$ for 5 days a week [30], whereas for GTB, it was $1\ \text{h}$ per week, 5 days a week until the euthanasia [31]. The control group animals were placed in the cage to simulate the stimulation and stress to which the other animals were submitted [32] but the PEMF device was shut off.

Histological processing

After euthanasia by decapitation, the left tibias of all animals were removed and immersed in a 10% paraformaldehyde buffered solution for $48\ \text{h}$ and were immersed in 70% alcohol until the moment of the three-dimensional radiographic analysis (Micro-CT) followed by histological slide preparation and subsequent histomorphometric analysis. The right tibias were immersed in ringer lactate solution in $-80\ ^\circ\text{C}$ freezer until the implant removal torque measurements were performed.

Removal torque

The right tibias were thawed at room temperature to measure the implant removal torques of the experimental groups.

For this, a vise was used to stabilize the bone and, through a digital torque wrench (MGT 12; Mark-10 Corp., Copiague, NY, USA), a counter torque was applied to the implant until there was movement.

Three-dimensional radiographic evaluation (microCT)

The left tibias were scanned by the SkyScan® microtomograph (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium) using $18\text{-}\mu\text{m}$ -thick ($89\ \text{kV}$ and $275\ \mu\text{A}$) sections, with rotation and 0.1-mm copper and aluminum filter. The obtained images were reconstituted determining the region of interest (ROI) using the NRecon® software (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium) and reconstructed with the Data Viewer® software (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium). The samples were standardized in a longitudinal position, which was more appropriate for the evaluation, and an area around the implant delimited by $0.5\ \text{mm}$ around the entire implant was defined using the CTAnalyser-CTAn® software (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium). It was possible to analyze the bone volume percentage (BV/TV), trabecular bone thickness (Tb.Th), and number (Tb.N) and bone mineral density (BMD) [33].

Histological procedures

The samples were washed in water and dehydrated in increasing concentrations of alcohol. The samples were immersed in xylol 98% and transferred to the methyl methacrylate (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and dibutyl phthalate (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) solution. For inclusion, the samples were soaked in a new solution with $3\ \text{g}$ of benzoyl peroxide, and in small amber glasses ($6 \times 4\ \text{mm}$), where a pre-base of this mixture was placed. The block obtained was cut in the Labcut apparatus (Labcut® 1010-Extex, Erios, Enfield, Connecticut, USA) with a diamond cutting disc (Buehler® IsoMet® Chicago, Illinois, USA). The polishing of the slices was performed with a polishing suspension (Extex® colloidal silica-Erios, Enfield, Connecticut, United States) with a felt disc on the polishing (Labpol® 8-12 Extex, Erios, Enfield, Connecticut, United States), to then be glued on plexiglass histological slides. The slices were worn on a polishing machine (Labpol® 8-12 Extex, Erios, Enfield, Connecticut, USA) using sandpaper (800 to 1200) until a thickness of approximately $0.25\ \text{mm}$. The slides were stained with 2% toluidine blue.

Histomorphometric analysis

BIC

The histomorphometric variables analyzed were the linear extension of the bone tissue in contact with the titanium (bone implant contact—BIC) between the implant threads in the mesial and distal regions of the tibia through which it was possible to observe the amount and type of the newly formed bone around the implant [29].

BAFO

For the occupied bone area fraction (BAFO) calculation, the total area of the evaluated threads and the area occupied by a bone space or absence were previously obtained, and then the percentage of the total area of threads occupied by bone tissue was determined in μm^2 .

For the standardization of measurements, a single examiner calibrated two more central regions selected through a $\times 100$ magnification in microscopy Axiophot® (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to an AxioCam MRc® 5 digital camera (Carl Zeiss Oberkochen, Germany) and transmission to the computer program AxioVision® Release 4.7.2., allowing better visualization of the region of interest and calibration of $1840\ \text{pixels}/\mu\text{m}$ by another examiner CMMN. Two slide image captures (right and left side of the implant) measured the histomorphometric variables. The

images were coded by another examiner MANJ, blinded to the groups so that an unbiased analysis of the data was performed.

Histomorphometric analysis was performed using the public domain NIH ImageJ 1.34 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

In vitro biological assays

Cellular culture

Briefly, the bone marrow cells of the femurs of both animal paws were separated according to the experimental groups, isolated and inserted into 250-mL and 75-cm² cell culture flasks (TPP, Biosystems, Curitiba, PR, Brazil) with alpha MEM minimum essential culture medium (Gibco®—Life Technologies, Baltimore, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas, Brazil) and gentamicin (500 µg/mL) (Gibco®—Life Technologies, Baltimore, USA). They were incubated at 37 °C, with atmospheric humidity containing 5% CO₂. Mesenchymal cells were selected for adherence to polystyrene and expanded until they reached confluence for subsequent cell plating. The cells were washed with PBS and 3 mL of 0.25% trypsin solution (Cultilab Ltda, Campinas, Brazil). The trypsin was neutralized, and the pool was transferred to a 15-mL Falcon tube (TTP, Biosystems, Curitiba, Brazil). After centrifugation at 5000 rpm for 5 min at 25 °C (Labnet-HERMLE Z 300K Centrifuge, NJ, USA), pellet formation was observed. The cells were distributed to the wells of the 24-well plates, and cell plating was performed at approximately 20,000 cells/well, and cells were counted using the Countess® automatic counter (Invitrogen®, Baltimore, USA). The osteogenic plaque culture medium (5 mg/mL ascorbic acid (Neon®, Neon Comercial, Suzano, SP, Brazil) and 2.16 g beta glycerophosphate (Sigma-Aldrich® ref 50020, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was changed every 2 days, and the development of the cells was evaluated by reversed-phase microscopy (Carl Zeiss® Microimaging GmbH—Axiovert 40C, Germany).

Cell proliferation

Briefly, after 4 days of cell culture, the culture medium was aspirated and the samples washed with PBS (Gibco®—Life Technologies, Baltimore, USA) and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. The samples received the DAPI dye (Fluorshield with DAPI—Sigma Aldrich®) and incubated at room temperature for 5 min. Ten fields from each group were randomly captured using the Axio HBO® 100 microscope (Carl Zeiss® Microimaging GmbH—Axiovert 40C, Germany) with a 20-fold magnification, and the nuclei present on the samples were quantified using ImageJ software version 6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Cell viability

Briefly, after 5 days of cell culture, a quantitative assessment of living cells was performed following exposure to the toxic agent by incubation with the MTT [3-(4,5-dimethylthio)zobromide] dye (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and spectrophotometric analysis of the incorporated dye. Aliquots of 0.5 mg/mL MTT in PBS were prepared, and the primary cultures were incubated with this solution for 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ oven. After this, the MTT solution was removed, and 500 µL of the DMSO (Dimethyl Sulfoxide Gibco®—Life Technologies, Baltimore, USA) solution was added to the wells for 10 min in a 37 °C and CO₂ oven. The aliquots were transferred to a 96-well plate (Greiner CELLSTAR®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for colorimetric measurement on a 570-nm wavelength microplate reader (Biotek® EL808IU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Total protein content

Total protein content was calculated after 7 days of culture with the removal of the culture medium, and the wells were washed three times with PBS at 37 °C and filled with 2 mL of 0.1% sodium lauryl sulfate (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to protein extraction. After 30 min, 1 mL of the solution from each well was mixed with 1 mL of Lowry's solution (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and left for 20 min at room temperature. Then, 1 mL of Folin and Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added to the mixture for 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 680 nm on a spectrophotometer (Micronal® AJX 1900, Micronal, SA, São Paulo, Brazil), and the total protein content was calculated from a standard curve determined by bovine albumin and expressed as µg/mL.

Alkaline phosphatase activity

Alkaline phosphatase activity was determined after 7 days of cell culture by using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Labtest Diagnóstica®, Labtest Diagnostic SA, Lagoa Santa, Minas Gerais Brazil). Initially, 50 µL of thymolphthalein monophosphate was mixed with 0.5 mL of 0.3 M diethanolamine buffer, pH 10.1. To the solution was added 50 µL aliquot of the lysates obtained from each well, remaining for 10 min at 37 °C in a water bath. For color development, 2 mL of 0.09 M Na₂CO₃ and 0.25 M NaOH were added. Absorbance was measured on a spectrophotometer (Micronal® AJX 1900, Micronal, SA, São Paulo, Brazil) using a wavelength of 590 nm, and alkaline phosphatase activity was calculated from the standard curve using thymolphthalein on a scale of 0.012 to 0.4 µmol thymolphthalein/h/µg protein.

Mineralization nodule formation and quantification

The formation of mineralization nodules was evaluated after 14 days of culture. The adhered cells were fixed in 10% formalin solution for 2 h at room temperature. The samples were dehydrated with a gradual series of alcohol and stained with 2% Alizarin S red (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), pH 4.2 for 10 min. Plate wells were photographed under Axio HBO 100 light microscopy (Carl Zeiss® Microimaging GmbH—Axiovert 40C, Germany) at 200-fold magnification.

For the quantification of mineralized formations, 800 µL of 10% acetic acid was added to each well containing the samples and incubated at room temperature under shaking for 30 min. The entire contents of each well were transferred to 1.5-mL centrifuge microtubes and vortexed (Vortex QL-901, Biomex Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brazil) for 30 s. The microtubes were taken to the water bath (Dubnoff Metabolic Bath—MA-095/CF, Marconi Equipamentos Para Laboratórios Ltda, Piracicaba, SP, Brazil) and heated for 10 min at 85 °C and transferred to an ice beaker for 5 min. They were centrifuged (Labnet-HERMLE Z 300K Centrifuge, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany) for 20 min, and 100 µL of the supernatants was transferred to a 96-well plate. To each well was added 40 µL of 10% ammonium hydroxide. The reading was performed in a microplate reader (Biotek—EL808IU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) under a wavelength of 405 nm.

Statistical analysis

The data obtained after the evaluations were submitted to statistical analysis through the computer programs: MINITAB (Minitab®, version 18.1, 2017) and GraphPad Prism (version 7, GraphPad® Software, La Jolla, California, USA).

Descriptive statistics consisted of the calculation of means and standard deviation, and inferential statistics were first performed using the Shapiro-Wilk test to verify data normality, followed by a two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post hoc test for multiple comparisons, both with a 5% conventional significance level, to assess the effect of treatment levels on euthanasia periods.

Results

Removal torque

The evaluation of implant removal torque revealed that in the intergroup analysis, GTB obtained statistically significant results compared to GTA at 7 days ($GTB \times GTA, p = 0.02$). In other periods, there were no differences between the groups (Fig. 1a).

Histomorphometric analysis

The evaluation results of the histomorphometric analysis are disclosed by the following graphs (Figs. 1b and c and 2). In the intergroup evaluation of BAFO (Fig. 1b), it was found that there were no statistically significant differences in any of the periods evaluated. In the intergroup evaluation of the BIC (Fig. 1c), data revealed that in 03 days, there was a greater amount of bone in contact with the implant in GTA and GTB groups compared with CG ($p = 0.04$ and 0.01 , respectively). At 07 days, the GTB presented higher BIC compared with the control group ($p = 0.01$). In the other periods, there were no intergroup differences for this parameter.

MicroCT analysis

Bone volume percentage (BV/TV)

There was a statistically significant difference in the intergroup comparison for all periods, and GTB presented a higher percentage of bone volume compared with the CG in 3 days ($p = 0.0002$), at 7 days comparing GC ($p = 0.0002$) and GTA ($p < 0.0001$), and at 21 days comparing GC ($p = 0.007$) and GTA ($p = 0.0002$). At 45 days, the statistical difference was between GTA and GTB ($p = 0.02$), where again the GTB presented a higher percentage of bone volume (Fig. 3a).

Trabecular bone thickness (Tb.Th)

CG presented statistically significant differences between the test groups in all periods. GTA presented greater trabecular thickness than GTB only in 03 days ($p < 0.0001$) (Fig. 3b).

Trabeculae number (Tb.N)

GTA ($p = 0.0002$) and GTB ($p = 0.005$) presented larger number of trabeculae compared with the control group CG at 07 days. At 21 days, GTB presented higher number of trabeculae compared with CG ($p = 0.01$) and at 45 days, GTA had better results compared with CG ($p = 0.02$) (Fig. 3c).

BMD

GTB presented higher BMD than GC and GTA at 07, 21, and 45 days with $p < 0.0001$, in both groups, in the period of 07 days. Similarly, it was observed at 21 days, when comparing the groups GC ($p = 0.0004$) and GTA ($p = 0.0002$), and at 45 days with $p < 0.0001$, for both GC and GTA. In the period of 03 days, there were no statistically significant differences between the groups (Fig. 3d).

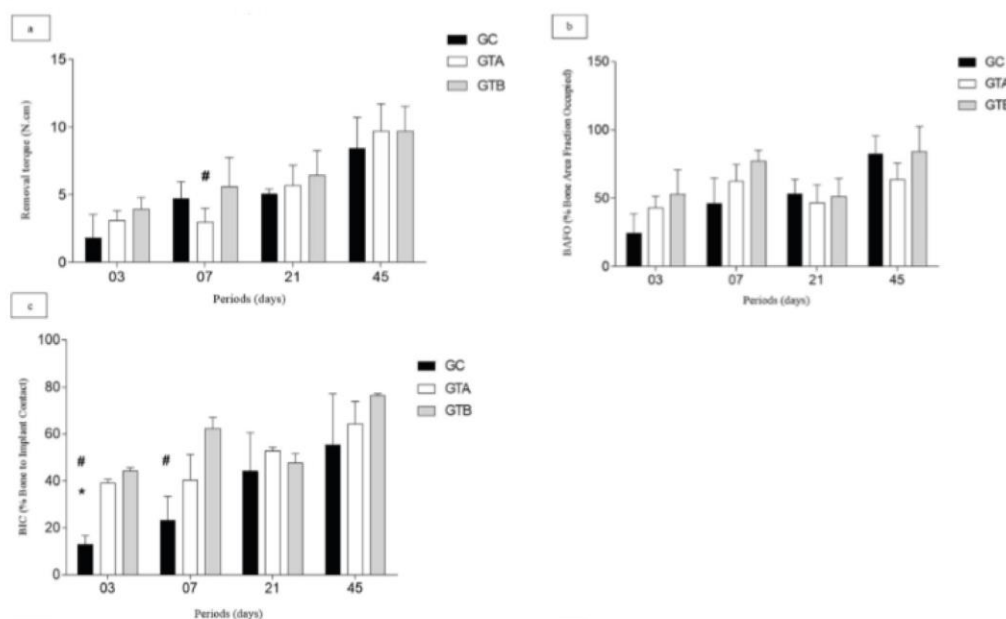


Fig. 1 Mean $\pm$ SD of removal torque (a), bone area fraction occupied (BAFO) (b), and bone contact implant (BIC) (c). Comparison intergroups in all periods. Statistical differences in intergroup comparisons for GTA (*) and GTB (#) groups. (ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$)

In vitro assays

Cell proliferation

In intergroup comparison, GTA showed higher number of stained nuclei than CG and GTB in 3 days ($p < 0.0001$; $p = 0.003$, respectively) and 45 days ($p = 0.003$; $p = 0.003$ respectively). GTB had higher expression of stained nuclei compared to CG at 03 and 21 days ($p = 0.001$ and $p = 0.003$, respectively) and compared with GC ($p = 0.003$) and GTA ($p = 0.003$) at 21 days (Figs. 4a and 5).

Cell viability

There was no statistically significant difference among the groups. Comparing the treatment groups, GTB showed more number of viable cells than GTA at 07 ($p < 0.0001$) and 45 ($p = 0.003$) days (Fig. 4b).

ALP

GTB expressed higher amount of alkaline phosphatase compared to the CG in the 7 days ($p = 0.0005$), 21 days ($p = 0.02$), and 45 days ($p = 0.01$). The GTA expressed a higher amount of alkaline phosphatase compared with the CG ($p = 0.005$). However, between the groups treated with PEMF, there was

no statistically significant difference for alkaline phosphatase expression (Fig. 4c).

Total protein content

GTB presented more amount than GTA at 7 days ($p < 0.0001$), and CG at 7 ($p < 0.0001$), 21, ($p < 0.0001$) and in 45 days ($p = 0.0001$) (Fig. 4d).

Mineralization nodule quantification

GTA expressed less mineralization nodules compared with GTB and GC at 3 days ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, respectively). At 7 days, GTB ($p = 0.01$) and GC ($p = 0.03$) expressed a higher number of mineralization nodules compared with GTA. In the other periods evaluated, there were no differences between the groups (Figs. 4e and 6).

Discussion

Recently, much research has been developed targeting the biological effects of PEMF on different parameters (waveforms, frequency, and intensity), in different tissues [28], and in different clinical situations [9, 21, 27], but without a

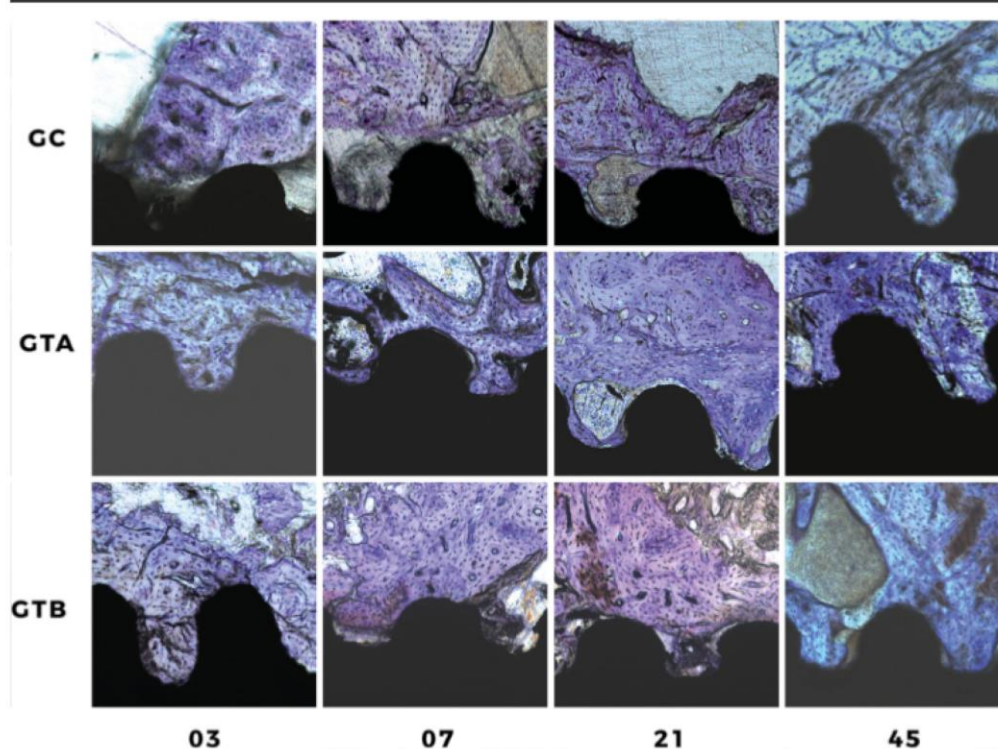


Fig. 2 Photomicrography of histomorphometric analysis on the experimental periods (3, 7, 21, and 45 days) of groups (GC, GTA, and GTB). Scale 500 μ m and $\times 10$ magnification

consensus on the ideal parameters for their use in osseointegration.

For this, we considered the 15 Hz frequency and ± 1 mT parameters for the electromagnetic field strength, which are trends evidenced in the literature responsible for the increase of *in vitro* osteogenic differentiation [19, 20, 34]. The removal torque results revealed higher removal torque values for the GTB than GTA at 7 days, and studies [35, 36] demonstrate that statistical differences in removal torque occur at early osseointegration periods, corroborating the results of this work.

For the histomorphometric analysis, there was no difference between GTB and GTA in BIC assays. However, these groups showed more BIC compared with the control. Higher BIC was observed in the comparison of GTB and control in the early periods of bone healing. These results are in agreement with the study by Jing et al. [37], in which the application of PEMF (15 Hz and 2 mT) promoted higher values for BIC and BAFO compared with the control group. However, although PEMF promotes a higher amount of BAFO

compared with control in the early periods, the results of the present study revealed no statistical differences between the experimental groups. A 10 Hz PEMF application (0.2 and 0.4 mT) [38] showed an increase in BIC only in 14 days of evaluation, different from our study where, from the third day, this difference was observed.

It is possible to notice the increase of this parameter in the exposed groups compared with the control. Comparing the results of different studies using 100 Hz, 4 h daily, and 0.2 mT parameters [1, 10, 39], it is noted that after 14 days of PEMF, there is an increase in BIC and BAFO compared with control, and the results for BIC are similar to those found in the present study. One of the possible reasons for this difference in BIC and BAFO would be the inability of the clot to fill the entire healing area, that is, the space between the recipient bed bone wall and the implant threads. Consequently, there is a compromised bone formation near the implant center [40]. This may be due to the drilling protocol which results in different biological responses with higher BIC and BAFO values [41] for intermediate drilling [42]. Also, implant design, healing area dimensions, and bone

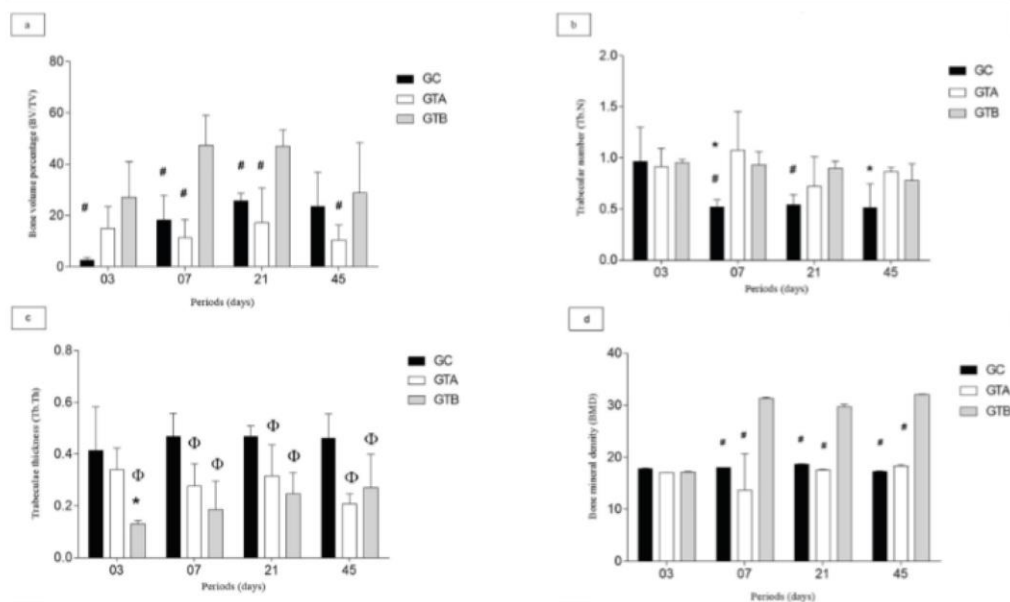


Fig. 3 Mean $\pm$ SD of microCT analysis. **a** Bone volume percentage (BV/TV). **b** Trabecular amount (Tb.N). **c** Trabecular thickness (Tb.Th). **d** Bone mineral density (BMD). Comparison intergroups in all periods.

type influence the osseointegration process of the implant resulting in different biological responses that affect histomorphometric measurements [42].

Micro-CT allows the analysis of bone tissue morphological parameters after exposure to a given treatment, indirectly representing tissue health status [33, 42]. The results revealed that the GTB promoted the highest proportion of (BV/TV) in all the periods analyzed. This finding is controversial to the application of PEMF (15 Hz, 2 mT 3 h daily) which promoted a subtle increase in bone volume compared to control [43]. However, in our study to trabecular thickness (Tb.Th), GTA showed better results at 3 days, and there was no difference in the number of trabeculae (Tb.N) evaluation between the groups exposed to PEMF in the periods. These findings corroborate the study in which with the use of PEMF (15 Hz and 2 mT) improved the bone architecture parameters compared with the control group [37].

Despite using different PEMF parameters, in a study with titanium implants inserted into tibias of ovariectomized animals, it was found that 50 Hz and 0.2 mT PEMF for 4 h daily also promoted higher bone volume rates [39]. Corroborating the present study, however, contrary to our findings, they noticed an increase in the number of bone trabeculae. Regarding BMD, the GTB promoted higher values than the GTA and control groups, just as in the study where 1 mT PEMF

promoted better effects on BMD and bone structural integrity [44] compared with 2 mT PEMF intensity [27]. With similar results, the application of PEMF (15 Hz, 0.8 mT) promoted higher BMD compared with the control [45].

The phenomena observed *in vivo* can be elucidated by *in vitro* analysis of cellular behavior after exposure to PEMF. Mesenchymal cells remain in an undifferentiated stage until they receive appropriate activation signals and begin the process of differentiation into specific strains according to the type of stimulus received [26] and the application of a bio-physical stimulus assists in this process [19].

This finding can also be observed by Bagheri et al. [46] in which the role of PEMF occurs in osteogenic differentiation of mesenchymal cells, assisting in different cellular stages, providing an increase in cell proliferation. In the present study, a significant increase in cell proliferation was also observed in the groups exposed to PEMF compared with the control in the initial evaluation period. The results found by studies with 15 Hz and 0.9 mT [6] and 0.1 mT [47] of PEMF also corroborate this study. However, we also noticed the same behavior in the late periods, unlike the findings in cell culture with 15 Hz and 7 mT PEMF [48].

The osteoblastic proliferation is a critical indicator of the activities of these cells, because, from this event, there is increased cellular differentiation and mineralization [16]. In the

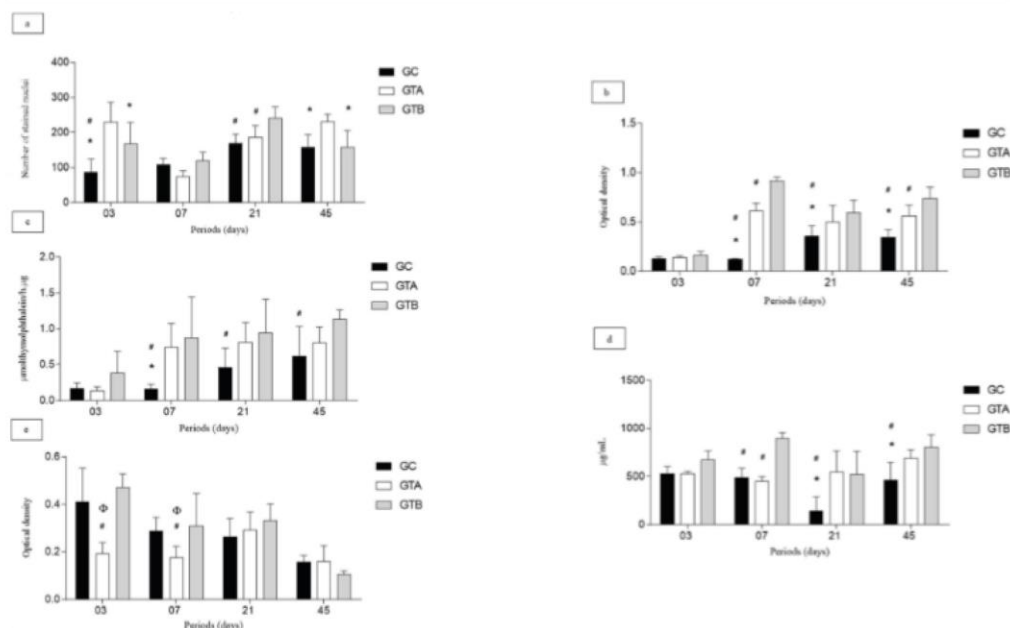


Fig. 4 Mean $\pm$ SD of in vitro analysis. **a** Cell proliferation. **b** Cell viability. **c** Alkaline phosphatase activity (ALP). **d** Total protein content. **e** Mineralization nodules quantification. Comparison

intergroups in all periods. Statistical differences in intergroup comparisons for GC (Φ), GTA (*), and GTB (#) groups. (ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$)

evaluation of cell viability after exposure to MTT, the PEMF groups presented a higher amount of viable osteoblasts compared with the control; however, in the initial and final stages, GTB revealed better results compared with GTA. The application of PEMF significantly influences osteogenesis by increasing gene expression, bone matrix deposition, cell proliferation, and differentiation of these cells [28], as observed in our study.

There is also the production of alkaline phosphatase activity (ALP), an important extracellular protein that marks osteoblastic differentiation. Detection of this exoenzyme is initially expressed in early periods of mineralization induction and can be used as a precedent marker of osteogenesis [49]. As the time to induce cell proliferation increases and osteogenic differentiation of cells progresses, ALP activity gradually increases [50].

Our results revealed that the quantification of ALP was higher in the PEMF groups compared with the control since the initial evaluation periods, corroborating the literature [20, 28, 47, 51]; however, no difference was observed in the expressed amount of this protein between exposure times. In contrast, another study showed that ALP activity was lower after exposure to PEMF [47], although they found increased proliferation and cell viability. Also, according to the authors,

for the 15 Hz and 0.1 mT PEMF parameters, the effect was restricted to proliferation and did not cause cell differentiation.

The final stage after osteoblast cell differentiation is the extracellular matrix mineralization. The differentiation capacity of these cells can be identified from the deposition of calcium salt in the cell matrix by staining with alizarin red [50]. Alteration of calcium salt levels is a marker of bone cell proliferation and differentiation and osteogenic potential of bone tissue. In our results regarding the mineralization nodules, quantification was statistically higher in the early periods, in the GTB and according to the literature [20].

These results suggest that shorter exposure time to PEMF may promote better osseointegration response of implants. Although it is difficult to compare all evaluated parameters among different protocol studies due to the variability of the models used in the PEMF [49], it is generally noted that PEMF therapy adjunct improves the outcomes for osseointegration both in vitro and in vivo [25].

The reason for this discrepancy in the literature is the different cell phenotypes used, the different frequencies and intensities of PEMF, and the different experimental periods selected for analysis [52]. Moreover, the authors point out that while controversy remains about the exact effects on

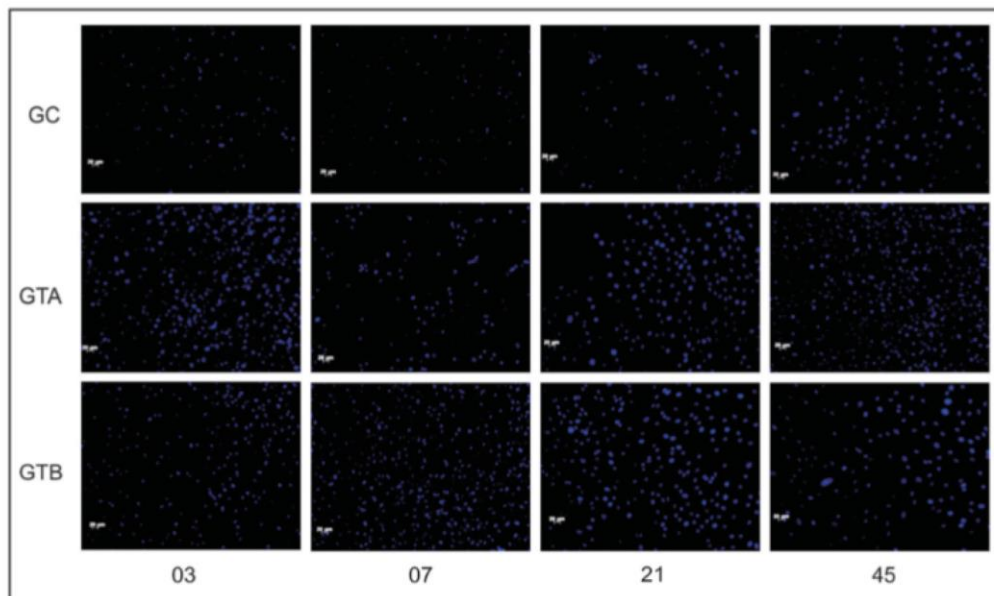


Fig. 5 Photomicrography of cell proliferation on the experimental periods (3, 7, 21, and 45 days) and groups (GC, GTA, and GTB). Scale 20 μ m and $\times$ 2 magnification

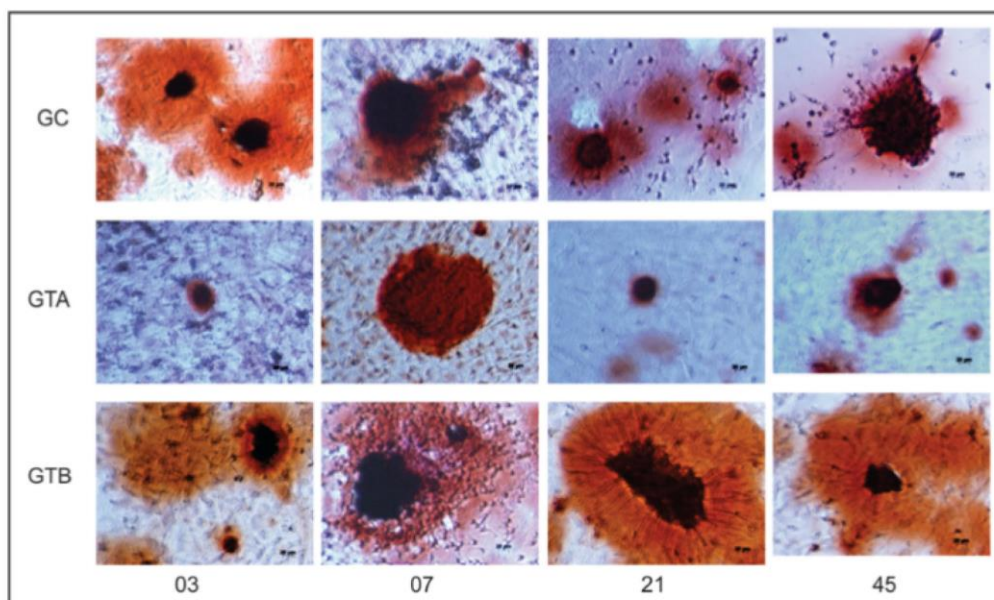


Fig. 6 Photomicrography of mineralization nodules on the experimental periods (3, 7, 21, and 45 days) and groups (GC, GTA, and GTB). Scale 20 μ m and $\times$ 5 magnification

14. Zhou J, Wang JQ, Ge BF, Ma XN, Ma HP, Xian CJ, Chen KM (2014) Different electromagnetic field waveforms have different effects on proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts in vitro. *Bioelectromagnetics* 35:30–38
15. He Z, Selvamurugan N, Warshaw J, Partridge NC (2018) Pulsed electromagnetic fields inhibit human osteoclast formation and gene expression via osteoblasts. *Bone* 106:194–203. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.09.020>
16. Zhai M, Jing D, Tong S, Wu Y, Wang P, Zeng Z, Shen G, Wang X, Xu Q, Luo E (2016) Pulsed electromagnetic fields promote in vitro osteoblastogenesis through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Bioelectromagnetics* 37(3):152–162. <https://doi.org/10.1002/bem.21961>
17. Waldorff EI, Zhang N, Ryaby JT (2017) Pulsed electromagnetic field applications: a corporate perspective. *J Orthop Translat* 9: 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.02.006>
18. Funk RH (2018) Coupling of pulsed electromagnetic fields (PEMF) therapy to molecular grounds of the cell. *Am J Transl Res* 10(5): 1260–1272
19. Galli C, Pedrazzi G, Mattioli-Belmonte M, Guizzardi S (2018) The use of pulsed electromagnetic fields to promote bone responses to biomaterials in vitro and in vivo. *Int J Biomater* 2018:8935750. <https://doi.org/10.1155/2018/8935750>
20. Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, Harrison BS (2015) The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res* 15(1):96–108. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.04.009>
21. Massari L, Benazzo F, Falez F, Perugia D, Pietrogrande L, Setti S et al (2019) Biophysical stimulation of bone and cartilage: state of the art and future perspectives. *Int Orthop* 43(3):539–551. <https://doi.org/10.1007/s00264-018-4274-3>
22. Kim EC, Leesungbok R, Lee SW, Hong JY, Ko EJ, Ahn SJ (2017) Effects of static magnetic fields on bone regeneration of implants in the rabbit: micro-CT, histologic, microarray, and real-time PCR analyses. *Clin Oral Implants Res* 28(4):396–405. <https://doi.org/10.1111/clr.12812>
23. Selvamurugan N, He Z, Rifkin D, Dabovic B, Partridge NC (2017) Pulsed electromagnetic field regulates microrna 21 expression to activate tgf- β signaling in human bone marrow stromal cells to enhance osteoblast differentiation. *Stem Cells Int* 24:503–527. <https://doi.org/10.1155/2017/2450327>
24. Tong J, Sun L, Zhu B, Fan Y, Ma X, Yu L, Zhang J (2017) Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients. *Bioelectromagnetics* 38(7):541–549. <https://doi.org/10.1002/bem.22076>
25. Naito Y, Yamada S, Jinno Y, Arai K, Galli S, Ichikawa T et al (2019) Bone-forming effect of a static magnetic field in rabbit femurs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 39(2):259–264. <https://doi.org/10.11607/prd.3220>
26. Jazayeri M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Bolouri B, Mirahmadi F, Farokhi M (2017) Effects of electromagnetic stimulation on gene expression of mesenchymal stem cells and repair of bone lesions. *Cell J* 19(1):34–44
27. Suryani L, Too JH, Hassanbhai AM, Wen F, Lin DJ, Yu N, Teoh SH (2019) Effects of electromagnetic field on proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3 cells. *Tissue Eng Part C Methods* 25(2):114–125. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2018.0364>
28. Daish C, Blanchard R, Fox K, Pivonka P, Pirogova E (2018) The application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for bone fracture repair: past and perspective findings. *Ann Biomed Eng* 46(4): 525–542. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-1982-1>
29. de Molon RS, Najarro JA, Morais-Camillo D, Verzola MHA, Faeda RS, Pepato MT et al (2013) Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res* 24(7):831–837. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02467.x>
30. Androjna C, Fort B, Zborowski M, Midura RJ (2014) Pulsed electromagnetic field treatment enhances healing callus biomechanical properties in an animal model of osteoporotic fracture. *Bioelectromagnetics* 35(6):396–405. <https://doi.org/10.1002/bem.21855>
31. McLeod KJ, Rubin CT (1992) The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 74(6):920–929 Erratum in: *J Bone Joint Surg Am* volume, 1992 Sep;74(8):1274
32. Tucker JJ, Cirone JM, Morris TR, Nuss CA, Huegel J, Waldorff EI et al (2016) Pulsed electromagnetic field therapy improves tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model. *J Orthop Res*. <https://doi.org/10.1002/jor.23333>
33. Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF (2018) Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. *Braz Dent J* 29(3):227–238. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201801979>
34. Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, Kontinen YT (2015) The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 9(1):31–40. <https://doi.org/10.1002/term.1612>
35. Omar OM, Lennerås ME, Suska F, Emanuelsson L, Hall JM, Palmquist A, Thomsen P (2011) The correlation between gene expression of proinflammatory markers and bone formation during osseointegration with titanium implants. *Biomaterials* 32(2):374–386. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.011>
36. Wennerberg A, Albrektsson T (2009) Structural influence from calcium phosphate coatings and its possible effect on enhanced bone integration. *Acta Odontol Scand* 67(6):333–340. <https://doi.org/10.1080/00016350903188325>
37. Jing D, Zhai M, Tong S, Xu F, Cai J, Shen G et al (2016) Pulsed electromagnetic fields promote osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in bone defect repair through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Sci Rep* 6:32045. <https://doi.org/10.1038/srep32045>
38. Barak S, Neuman M, Iezzi G, Piatelli A, Perrotti V, Gabet Y (2016) A new device for improving dental implants anchorage: a histological and micro-computed tomography study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 27(8):935–942. <https://doi.org/10.1111/clr.12661>
39. Akca K, Sarac E, Baysal U, Fanuscu M, Chang T-L, Cehreli M (2007) Micro-morphologic changes around biophysically stimulated titanium implants in ovariectomized rats. *Head Face Med* 3:2B
40. Beutel BG, Danna NR, Granato R, Bonfante EA, Marin C, Tovar N, Suzuki M, Coelho PG (2016) Implant design and its effects on osseointegration over time within cortical and trabecular bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104(6):1091–1097. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33463>
41. Baires-Campos FE, Jimbo R, Bonfante EA, Fonseca-Oliveira MT, Moura C, Zanetta-Barbosa D (2015) Drilling dimension effects in early stages of osseointegration and implant stability in a canine model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 20:471–479
42. Soares PB, Moura CC, Claudino M, Carvalho VF, Rocha FS, Zanetta-Barbosa D (2015) Influence of implant surfaces on osseointegration: a histomorphometric and implant stability study in rabbits. *Braz Dent J* 26(5):451–457. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300411>
43. Ibiwoye MO, Powell KA, Grabner MD, Patterson TE, Sakai Y, Zborowski M, Wolfman A, Midura RJ (2004) Bone mass is preserved in a critical-sized osteotomy by low energy pulsed electromagnetic fields as quantitated by in vivo micro-computed tomography. *J Orthop Res* 22(5):1086–1093

14. Zhou J, Wang JQ, Ge BF, Ma XN, Ma HP, Xian CJ, Chen KM (2014) Different electromagnetic field waveforms have different effects on proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts in vitro. *Bioelectromagnetics* 35:30–38
15. He Z, Selvamurugan N, Warshaw J, Partridge NC (2018) Pulsed electromagnetic fields inhibit human osteoclast formation and gene expression via osteoblasts. *Bone* 106:194–203. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.09.020>
16. Zhai M, Jing D, Tong S, Wu Y, Wang P, Zeng Z, Shen G, Wang X, Xu Q, Luo E (2016) Pulsed electromagnetic fields promote in vitro osteoblastogenesis through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Bioelectromagnetics* 37(3):152–162. <https://doi.org/10.1002/bem.21961>
17. Waldorff EI, Zhang N, Ryaby JT (2017) Pulsed electromagnetic field applications: a corporate perspective. *J Orthop Translat* 9: 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.02.006>
18. Funk RH (2018) Coupling of pulsed electromagnetic fields (PEMF) therapy to molecular grounds of the cell. *Am J Transl Res* 10(5): 1260–1272
19. Galli C, Pedrazzi G, Mattioli-Belmonte M, Guizzardi S (2018) The use of pulsed electromagnetic fields to promote bone responses to biomaterials in vitro and in vivo. *Int J Biomater* 2018:8935750. <https://doi.org/10.1155/2018/8935750>
20. Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, Harrison BS (2015) The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res* 15(1):96–108. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.04.009>
21. Massari L, Benazzo F, Falez F, Perugia D, Pietrogrande L, Setti S et al (2019) Biophysical stimulation of bone and cartilage: state of the art and future perspectives. *Int Orthop* 43(3):539–551. <https://doi.org/10.1007/s00264-018-4274-3>
22. Kim EC, Leesungbok R, Lee SW, Hong JY, Ko EJ, Ahn SJ (2017) Effects of static magnetic fields on bone regeneration of implants in the rabbit: micro-CT, histologic, microarray, and real-time PCR analyses. *Clin Oral Implants Res* 28(4):396–405. <https://doi.org/10.1111/clr.12812>
23. Selvamurugan N, He Z, Rifkin D, Dabovic B, Partridge NC (2017) Pulsed electromagnetic field regulates microrna 21 expression to activate tgf- β signaling in human bone marrow stromal cells to enhance osteoblast differentiation. *Stem Cells Int* 24:503–527. <https://doi.org/10.1155/2017/2450327>
24. Tong J, Sun L, Zhu B, Fan Y, Ma X, Yu L, Zhang J (2017) Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients. *Bioelectromagnetics* 38(7):541–549. <https://doi.org/10.1002/bem.22076>
25. Naito Y, Yamada S, Jinno Y, Arai K, Galli S, Ichikawa T et al (2019) Bone-forming effect of a static magnetic field in rabbit femurs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 39(2):259–264. <https://doi.org/10.11607/prd.3220>
26. Jazayeri M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Bolouri B, Mirahmadi F, Farokhi M (2017) Effects of electromagnetic stimulation on gene expression of mesenchymal stem cells and repair of bone lesions. *Cell J* 19(1):34–44
27. Suryani L, Too JH, Hassanbhai AM, Wen F, Lin DJ, Yu N, Teoh SH (2019) Effects of electromagnetic field on proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3 cells. *Tissue Eng Part C Methods* 25(2):114–125. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2018.0364>
28. Daish C, Blanchard R, Fox K, Pivonka P, Pirogova E (2018) The application of pulsed electromagnetic fields (PEMFs) for bone fracture repair: past and perspective findings. *Ann Biomed Eng* 46(4): 525–542. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-1982-1>
29. de Molon RS, Najarro JA, Morais-Camillo D, Verzola MHA, Faeda RS, Pepato MT et al (2013) Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res* 24(7):831–837. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02467.x>
30. Androjna C, Fort B, Zborowski M, Midura RJ (2014) Pulsed electromagnetic field treatment enhances healing callus biomechanical properties in an animal model of osteoporotic fracture. *Bioelectromagnetics* 35(6):396–405. <https://doi.org/10.1002/bem.21855>
31. McLeod KJ, Rubin CT (1992) The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 74(6):920–929 Erratum in: *J Bone Joint Surg Am* volume, 1992 Sep;74(8):1274
32. Tucker JJ, Cirone JM, Morris TR, Nuss CA, Huegel J, Waldorff EI et al (2016) Pulsed electromagnetic field therapy improves tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model. *J Orthop Res*. <https://doi.org/10.1002/jor.23333>
33. Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF (2018) Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. *Braz Dent J* 29(3):227–238. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201801979>
34. Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, Kontinen YT (2015) The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 9(1):31–40. <https://doi.org/10.1002/term.1612>
35. Omar OM, Lenneräs ME, Suska F, Emanuelsson L, Hall JM, Palmquist A, Thomsen P (2011) The correlation between gene expression of proinflammatory markers and bone formation during osseointegration with titanium implants. *Biomaterials* 32(2):374–386. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.011>
36. Wennerberg A, Albrektsson T (2009) Structural influence from calcium phosphate coatings and its possible effect on enhanced bone integration. *Acta Odontol Scand* 67(6):333–340. <https://doi.org/10.1080/00016350903188325>
37. Jing D, Zhai M, Tong S, Xu F, Cai J, Shen G et al (2016) Pulsed electromagnetic fields promote osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in bone defect repair through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Sci Rep* 6:32045. <https://doi.org/10.1038/srep32045>
38. Barak S, Neuman M, Iezzi G, Piatelli A, Perrotti V, Gabet Y (2016) A new device for improving dental implants anchorage: a histological and micro-computed tomography study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 27(8):935–942. <https://doi.org/10.1111/clr.12661>
39. Akca K, Sarac E, Baysal U, Fanuscu M, Chang T-L, Cehreli M (2007) Micro-morphologic changes around biophysically stimulated titanium implants in ovariectomized rats. *Head Face Med* 3:2B
40. Beutel BG, Danna NR, Granato R, Bonfante EA, Marin C, Tovar N, Suzuki M, Coelho PG (2016) Implant design and its effects on osseointegration over time within cortical and trabecular bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104(6):1091–1097. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33463>
41. Baires-Campos FE, Jimbo R, Bonfante EA, Fonseca-Oliveira MT, Moura C, Zanetta-Barbosa D (2015) Drilling dimension effects in early stages of osseointegration and implant stability in a canine model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 20:471–479
42. Soares PB, Moura CC, Claudino M, Carvalho VF, Rocha FS, Zanetta-Barbosa D (2015) Influence of implant surfaces on osseointegration: a histomorphometric and implant stability study in rabbits. *Braz Dent J* 26(5):451–457. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300411>
43. Ibiwoye MO, Powell KA, Grabner MD, Patterson TE, Sakai Y, Zborowski M, Wolfman A, Midura RJ (2004) Bone mass is preserved in a critical-sized osteotomy by low energy pulsed electromagnetic fields as quantitated by in vivo micro-computed tomography. *J Orthop Res* 22(5):1086–1093

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 17/2016, intitulado:- "Efeito do campo eletromagnético pulsado na osseointegração de implantes inseridos em tíbias de ratos: Estudo in vivo e in vitro " sob a responsabilidade de **MARIA APARECIDA NEVES JARDINI**, tendo como colaboradora Camila Magnoni Moretto Nunes e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 10/02/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	23/02/2017 a 23/01/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato/heterogênico Wistar
Nº de Animais	60
Peso/Idade	250-300 grs / 90 dias
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 10 de fevereiro de 2017


Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora

Av. Eng. Francisco José Longo, 771 – Al. São Diniz
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax: (12) 3947-9010 / garden@fotjc.unesp.br / komori@fotjc.unesp.br