



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

**NICOLE BERTON DE MOURA**

**EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO PULSADO NA  
REPARAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO NA CALOTA  
DE RATOS**

2022

**NICOLE BERTON DE MOURA**

**EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO PULSADO NA  
REPARAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO NA CALOTA  
DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardimi

Coorientadora: Dra. Camila Lopes Ferreira

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).

Moura, Nicole Berton Efeito do Campo Eletromagnético Pulsado na reparação de defeito ósseo crítico na calota de ratos. / Nicole Berton Moura. - São José dos Campos : [s.n.], 2022. 119 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardimi

Coorientadora: Camila Lopes Ferreira

1. Regeneração Óssea. 2. Calota. 3. Osteogênese. 4. Campos Eletromagnéticos. 5. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico. I. Jardimi, Maria Aparecida Neves, orient. II. Ferreira, Camila Lopes, 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. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim** (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dra. Andréa Carvalho de Marco**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Dr. Marcelo Lelis Zuppardo**

Universidade do vale do paraíba - UNIVAP

São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de agosto de 2022.

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, que me sustentou e me capacitou a cada dia, colocou pessoas maravilhosas em meu caminho e abriu todas as portas para que este trabalho pudesse ser concretizado. Nada poderia fazer sem ele, toda a honra e glória são para ti, senhor! É tudo sobre ti e nada sobre mim.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marcio e Dora, e aos meus irmãos, Camilla e Pietro por todo apoio, amor, incentivo e por não medirem esforços para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos e estar aqui hoje.

Ao meu marido, Lucas por todo apoio, amor, paciência e compreensão em todos os momentos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Ciência e Tecnologia – Unesp, por todos estes anos de aprendizado e acolhimento, que me trouxeram até aqui.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no período de 01/03/2020 a 01/08/2022.

Ao programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Prof<sup>a</sup> Dra Andréa Carvalho de Marco, por toda dedicação, acolhimento e contribuição neste trabalho e na nossa formação.

À minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup> Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim, por toda a dedicação, paciência, amizade, ensinamentos e por ser uma grande inspiração e exemplo para mim.

Ao prof. Assoc. Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes, pela sua imensa dedicação e comprometimento em contribuir com este trabalho e com nosso aprendizado.

Às queridas Camila Lopes Ferreira e Camilla Magnoni Moretto, por todo o carinho e dedicação neste trabalho. Minha eterna gratidão a vocês.

Às queridas funcionárias Marcinha e Valéria, pelas conversas, carinho, atenção e por todo suporte na clínica e no preparo dos materiais do biotério.

À Prof<sup>a</sup> Assoc. Mônica Fernandes Gomes, por abrir as portas do CEBAPE para a realização deste e de muitos outros trabalhos.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial Victória Clara da Silva Lima e Tainá da Silva Tricolly, por toda amizade, companheirismo, generosidade e oportunidades que me proporcionaram.

"Somente se aproxima da perfeição quem a procura com constância, sabedoria, e sobretudo humildade" – Jigoro Kano

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Aspectos éticos .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Delineamento experimental.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Cirurgia para confecção do defeito ósseo crítico.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Exposição ao Campo Eletromagnético Pulsado (CEMP).....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Eutanásia dos animais.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6 Obtenção das imagens de TCFC.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Obtenção dos cortes de TCFC para análise de textura.....</b>	<b>25</b>
<b>3.8 TCFC para análise de volume.....</b>	<b>30</b>
<b>3.9 Processamento histológico .....</b>	<b>33</b>
<b>3.10 Análise estatística .....</b>	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Análise histomorfométrica intragrupo.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Análise histomorfométrica intergrupo.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Análise das imagens de TCFC.....</b>	<b>43</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>

<b>APÊNDICES</b> .....	<b>76</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>119</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CEMP	Campo Eletromagnético Pulsado
CEM	Campo Eletromagnético
GC	Grupo Controle
GT1h	Grupo teste 1 hora
GT3h	Grupo teste 3 horas
DOC	Defeito Ósseo Crítico
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
AT	Análise de textura

Moura NB. Efeito do Campo Eletromagnético Pulsado na reparação de defeito ósseo crítico na calota de ratos. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

## RESUMO

O reparo de defeitos ósseos críticos representa um grande desafio clínico, dentre as terapias adjuvantes que apresentam um potencial benefício na aceleração do reparo ósseo destaca-se o CEMP, o qual por meio da sua estimulação biofísica é capaz de modular parâmetros fisiológicos de diferenciação, proliferação e mineralização das células ósseas. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de dois protocolos de terapia com CEMP na neoformação óssea em defeitos críticos nas calotas de ratos. Noventa e seis ratos machos adultos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais GC: (n= 32), GT1h: (n= 32) e GT3h: (n= 32). Os animais foram submetidos à cirurgia para a confecção de defeito crítico na calota craniana e à terapia com CEMP seguindo os seguintes parâmetros fixos: 25 ciclos de -1 mTesla a + 1 mTesla em 200 microssegundos que se repetiram à taxa de 15 Hz. O tempo de duração da exposição ao CEMP nos grupos testes foram de 1 hora (GT1h) e de 3 horas (GT3h), ambos durante 5 dias por semana. Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos 14, 21, 45 e 60 dias. Os espécimes foram processados para análise histológica, histomorfométrica e para análises de textura e volume, obtidas por meio de TCFC. As análises histomorfométrica e de volume revelaram que não houve diferença estaticamente significativa no reparo dos defeitos ósseos entre os grupos que receberam a terapia com CEMP e o GC. A análise de textura revelou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos somente para o parâmetro entropia, no qual o grupo GT1h apresentou um maior valor comparado ao GC, ambos no período de 21 dias. Conclusão: não foi possível neste estudo mostrar um potencial benefício da utilização do CEMP na cicatrização óssea do DOC na calota de ratos. Dessa forma, esta região deve ser melhor explorada em estudos futuros, assim como a busca pelos parâmetros ideais relacionados ao gerador do CEMP de forma a maximizar os efeitos no reparo ósseo.

Palavras-chave: Regeneração Óssea. Calota. Osteogênese. Campos Eletromagnéticos. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico.

*Moura NB. Effect of the Pulsed Electromagnetic Field in the repair of a calvaria critical bone defect in rats. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.*

### **ABSTRACT**

*The repair of critical bone defects represents a major clinical challenge, among the adjuvant therapies that have a potential benefit in accelerating bone repair, PEMF stands out, which through its biophysical stimulation can modulate physiological parameters of differentiation, proliferation and mineralization of bone cells. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of two protocols of therapy with PEMF on bone neof ormation on calvaria critical defects in rats. Ninety-six adult male rats were randomly divided into 3 experimental groups CG: (n=32), GT1h: (n=32) and GT3h: (n=32). The animals were submitted to surgery for the creation of a critical defect in the skull and to therapy with PEMF following the following fixed parameters: 25 cycles of -1 mTesla to + 1 mTesla in 200 microseconds that were repeated at a rate of 15 Hz. The duration of exposure to PEMF in the test groups was 1 hour (GT1h) and 3 hours (GT3h), both for 5 days a week. The animals were euthanized at 14, 21, 45 and 60 days. The specimens were processed for histological, histomorphometric and texture and volume analysis, obtained by CBCT. Histomorphometric and volume analyzes revealed that there was no statistically significant difference in the repair of bone defects between both groups receiving PEMF therapy and GC. The texture analysis revealed that there was a statistically significant difference between the groups, except for the entropy parameter, in which the GT1h group presented a higher value compared to CG, both in the period of 21 days. Conclusion: it was not possible in this study to show a potential benefit of using PEMF on bone healing of calvaria critical defects. Therefore, this region should be better explored in future studies, as well as seeking the ideal parameters related to the PEMF generator in order to maximize effects on bone repair.*

*Keywords: Bone Regeneration. Calvaria. Osteogenesis. Electromagnetic Fields. Cone Beam Computed Tomography.*

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração dos defeitos ósseos causados por diferentes agentes etiológicos como trauma, infecção, radiação prévia e excisão de um tumor ósseo (Huang et al., 2022) continuam sendo um grande desafio na odontologia. A regeneração óssea é um processo complexo que relaciona diversos eventos celulares e moleculares, que fisiologicamente necessitam de mais tempo para a completa renovação do local afetado. A cicatrização óssea pode ser incentivada pela aplicação de moléculas, como por exemplo proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) ou também, através de estímulos físicos, como os campos eletromagnéticos pulsados (CEMPs) (Nunes et al., 2019). Estes são campos de baixa frequência que apresentam formas de ondas quadradas ou trapezoidais e amplitudes específicas, variando entre 6 e 500 Hz (Hu et al., 2020; Lullini et al., 2020). São caracterizados por uma alta taxa de variação (Tesla / s) que induz correntes bioelétricas nos tecidos, os quais promovem efeitos biológicos (Lullini et al., 2020). Estes efeitos gerados por campos eletromagnéticos (CEMs) têm sido amplamente investigados na literatura ao longo das últimas quatro décadas (Peng et al., 2020).

Estudos mostram que a terapia utilizando o CEMP é capaz de promover efeitos terapêuticos satisfatórios em uma ampla gama de doenças ósseas, tais como fraturas recentes, de união tardia, desunidas e infectadas (Assiotis et al., 2012; Hannemann et al., 2014; Qiu et al., 2020); osteoporose (Wang et al., 2021) osteoartrites (Moretti et al., 2021; Tong et al., 2022); e pseudoartroses (Cebrián et al., 2010), isto porque estimulam a proliferação e ativação de osteoblastos, processos neo-angiogênicos assim como diversas vias de sinalização celular, requisitos essenciais na promoção do reparo ósseo (Yuan et al., 2018). Assim, os CEMPs vem sendo amplamente pesquisados na área de

ortopedia também pelas suas vantagens sobre os métodos farmacológicos convencionais, das quais destacam-se: efeitos sistêmicos limitados; alta adesão do paciente e por ser um método não invasivo e de custo relativamente baixo (Guo et al., 2012; Oltean-Dan et al., 2019). Além disso, a literatura descreve benefícios de relevância clínica, como: diminuição no edema; redução de dor e no tempo de cicatrização de feridas (Guo et al., 2012; Peng et al., 2020); além de levar a uma aceleração na resolução do hematoma (Lee et al., 1997) e na consolidação óssea (Biggane et al., 2016).

Na área de implantodontia, a estimulação biofísica do tecido ósseo através das modalidades terapêuticas de estimulação elétrica, CEMP e vibração mecânica, há tempos é testada para promover reparo de feridas e diferenciação tecidual na interface osso-implante (Akca et al., 2007; Galli et al., 2018, Wang et al., 2014), o que desperta um grande interesse dessa modalidade também nessa área. As primeiras tentativas de usar os CEMPs após a substituição de articulações tinham o objetivo de facilitar a osteointegração do implante devido a melhora na osteogênese e no crescimento ósseo. (Lullini et al., 2020)

Com a descoberta da piezoelectricidade e dos potenciais bioelétricos no osso (Fukada, Yasuda, 1957), levantou-se a possibilidade de que a energia elétrica aplicada externamente pudesse modificar o comportamento das células ósseas. O mecanismo de ação exato dos CEMPs ainda não é totalmente elucidado na literatura e ainda está em debate, porém relatos de mecanismos em nível celular e molecular são constantemente abordados (Hu et al., 2020). As células possuem uma membrana plasmática eletricamente carregada, e que tem por função, regular a concentração de íons intracelular e extracelular. Essa precisão da regulação iônica gera um potencial de membrana, que é também considerado um potencial elétrico de membrana. (Azan et al., 2017; Nunes et al., 2020; Ross et al., 2015).

O potencial elétrico de membrana é responsável por gerar uma resposta bioquímica e fisiológica no organismo, traduzido, por exemplo, como a propagação de um impulso nervoso em uma fibra nervosa, assim como a absorção dos íons de cálcio pelos ossos. (Nunes et al., 2020; Yuan et al., 2018). A existência do potencial elétrico de membrana na célula origina campos eletromagnéticos endógenos. Portanto, quando ocorre a estimulação externa por um CEMP, ocorre a potencialização dos efeitos celulares, visto que a membrana celular é o principal alvo de ação do CEMP. (Nunes et al., 2020; Ross et al., 2015; Yuan et al., 2018) Sendo assim, ele afeta algumas funções biológicas, como a expressão gênica; destino e diferenciação celular, porém apenas induz esses efeitos dentro de um certo intervalo de baixas frequências e baixas amplitudes (Ross et al., 2015).

Além disso, a membrana celular desempenha um papel importante na estimulação óssea. Estudos pré-clínicos mostraram que os CEMPs ativam os receptores de membrana e os canais transmembranares que podem ter um efeito promotor na função das células ósseas, mineralização óssea, reparo ósseo e redução do processo inflamatório (Massari et al., 2019). A estimulação física inicia as cascatas de sinalização, que efetivamente promovem a osteogênese e a angiogênese de maneira espaço-temporal orquestrada e, finalmente, aprimoram a capacidade de autorreparo dos tecidos ósseos (Yuan et al., 2018).

Com relação a pesquisas pré-clínicas, o modelo de estudo de tecidos ósseos craniofaciais *in vivo* mais utilizado na literatura é a realização de defeitos críticos criados na calotas cranianas de ratos (Huang et al., 2022), por definição clássica, um defeito de tamanho crítico é o menor tamanho de defeito de tecido que não cicatriza completamente ao longo da vida natural de um animal, sendo que a partir de 4 mm já pode ser considerado um defeito ósseo crítico (DOC) (Nunes et al., 2019). Nesse contexto, o reparo deste defeito é um grande desafio, uma vez que, nessas condições, o tecido ósseo não é capaz de se regenerar

espontaneamente. Desse modo, faz-se necessário a utilização de medidas que sejam capazes de promover a regeneração tecidual, ao reconstruir o tecido perdido e restaurar a estabilidade mecânica e funcional, bem como de técnicas que possibilitem uma avaliação adequada desse processo.

Embora tenham sido demonstrados efeitos positivos no reparo ósseo associados ao CEMP (Jing et al., 2016; Liu et al., 2021; Varani et al., 2021, Yucong et al., 2020), a literatura ainda é controversa principalmente no que diz respeito a protocolos relacionados aos parâmetros do CEMP – intensidade, frequência, duração da exposição e amplitude - (Di Bartolomeo et al., 2022), sendo necessários outros estudos em animais para compreender os mecanismos de ação no reparo do defeito crítico e uma potencial aplicação em humanos.

## **2 PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como objetivo investigar a eficácia de dois protocolos com diferentes tempos de aplicação do Campo Eletromagnético Pulsado no reparo ósseo em um modelo de defeito crítico na calvária de ratos.

### **2.1 Objetivos específicos**

Quantificar a neoformação óssea por meio de histomorfometria e avaliar o reparo do defeito ósseo por tomografia computadorizada de feixe cônico, utilizando a análise de textura e volume nos períodos de 14, 21, 45 e 60 dias.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP com protocolo nº 10/2020 e seguiu às normas ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments).

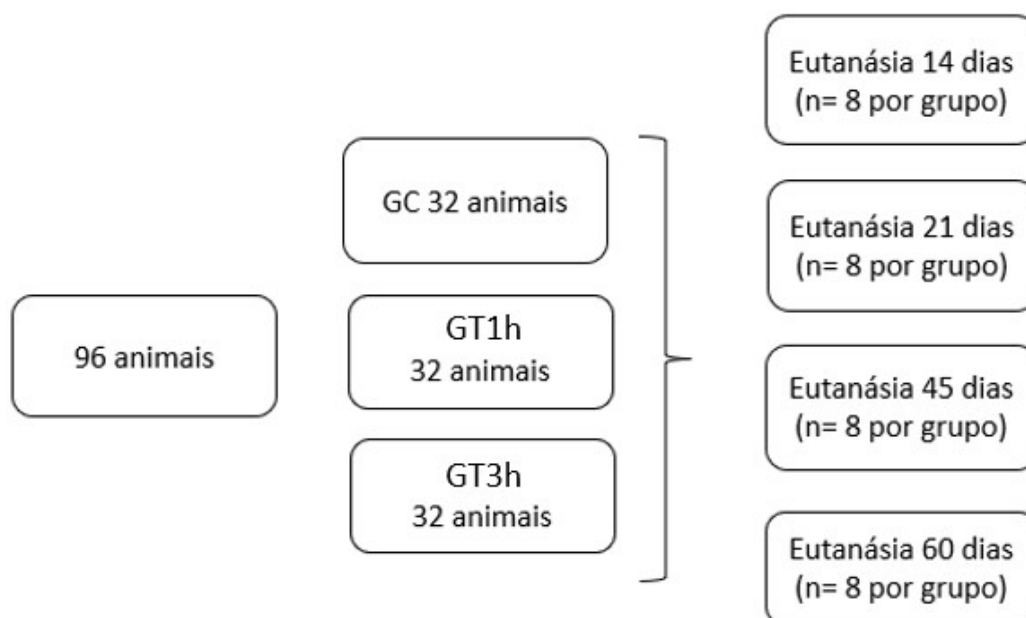
### 3.2 Delineamento experimental

Noventa e seis ratos machos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) foram fornecidos pelo Biotério Central da Unesp – Campus de Botucatu-SP, com noventa dias de idade, pesando em torno de 250 a 300 gramas, mantidos em gaiolas em temperatura ambiente, alimentados com ração e água a vontade. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais:

Grupo Controle (GC; n= 32), onde foi realizada somente a cirurgia de defeito ósseo crítico da calota craniana e os animais não foram submetidos à exposição ao CEMP; Grupo Teste 1h (GT1h; n= 32), onde foi realizada a cirurgia de defeito ósseo crítico e subsequente exposição ao CEMP pelo período de 1 hora por 5 dias na semana; e Grupo Teste 3h (GT3h; n= 32), no qual foi realizada a cirurgia de defeito ósseo crítico, além da exposição ao CEMP pelo período de 3 horas por 5 dias na semana. Cada grupo foi subdividido em 4 períodos de

eutanásia (14, 21, 45 e 60 dias). A figura 1 ilustra a distribuição dos grupos experimentais.

Figura 1 - Esquema da divisão dos grupos experimentais



Fonte: Elaborada pelo autor.

O tamanho da amostra foi baseado em estudos anteriores (Aroni et al., 2019) sobre defeitos ósseos críticos na calota de ratos adultos. Para o cálculo do tamanho da amostra, foram utilizados os dados de porcentagem de formação óssea, sendo a diferença mínima das médias entre os grupos com diferenças significativas, de 27,9% com desvio padrão de 9,0%. Assim, ao estabelecer poder  $\beta$  de 0,90 e erro  $\alpha$  de 0,05, determinou-se um número mínimo de 6

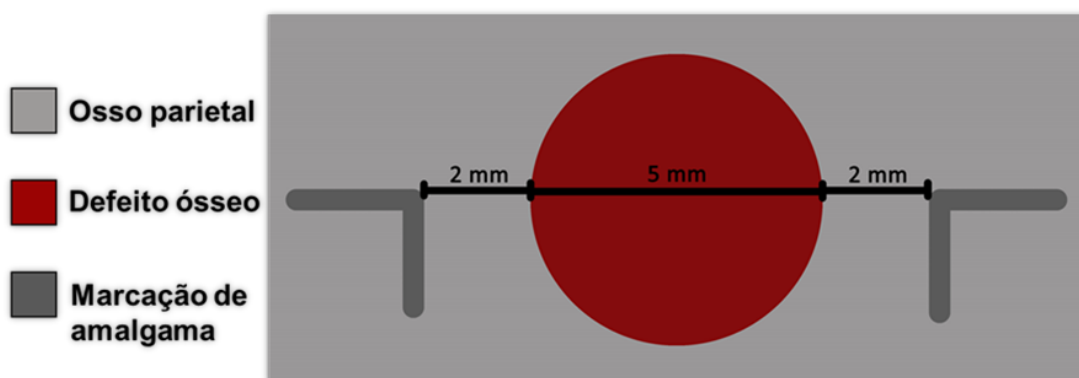
animais por grupo. Utilizamos mais dois animais por grupo para evitar a perda do poder estatístico devido à possível perda de animais durante o período.

### 3.3 Cirurgia para confecção do defeito ósseo crítico

Os animais foram anestesiados com cetamina 10% (Dopalen - Agribrands, Paulínea, Brasil) 100mg/Kg e xilazina 2% (Anasedan - Vetbrands, Jacareí, Brasil) 10mg/Kg, administradas via intramuscular (IM), utilizando agulha de insulina estéril, seguindo o guia indicado pelo Biotério do ICT-UNESP.

Após a anestesia, a região frontal foi tricotomizada, utilizando-se lâminas de barbear. Em seguida foi realizada a antisepsia dessas regiões com solução de gluconato de clorexidina 0,2% e o defeito ósseo crítico foi confeccionado no osso parietal (Figura 2).

Figura 2 - Esquema de representação do defeito ósseo crítico



Fonte: Elaborada pelo autor.

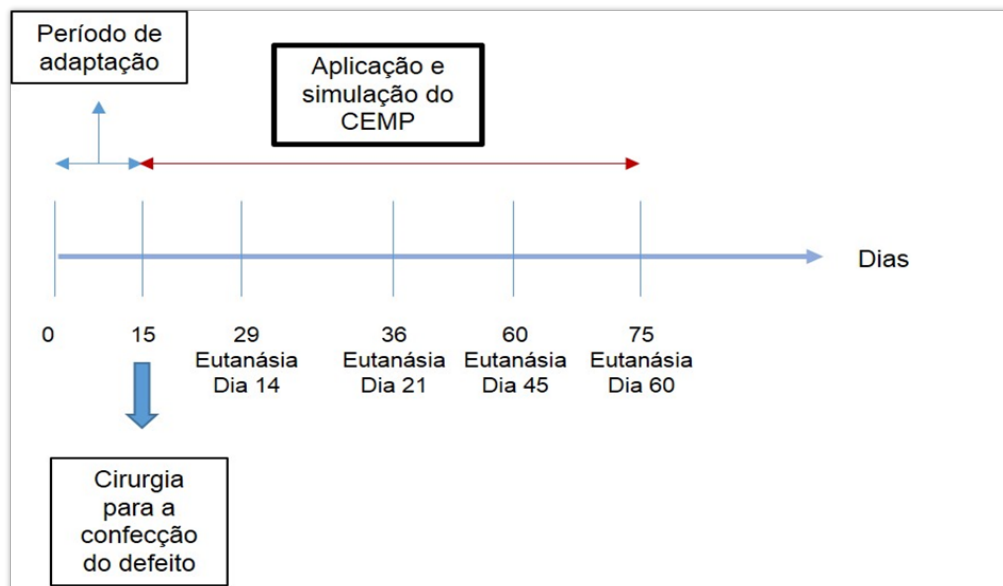
Para isso, uma incisão linear de aproximadamente 2,0 cm foi feita no centro da calvária do animal, expondo o osso parietal. O defeito foi realizado com o auxílio de uma broca tipo trefina com diâmetro externo de 5 mm (Neodent – Brasil), sob abundante irrigação com solução fisiológica e um motor elétrico (Driller BLM 600 Plus), o qual permite o controle da velocidade em 960 rpm, e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril, tomando-se cuidado para evitar danos à dura-máter ou ao seio sagital superior.

Após a remoção, o bloco ósseo foi descartado. Em seguida, após o controle do sangramento, marcações de amálgama foram realizadas - em forma de L, como mostra a figura 2 – na calota craniana, por meio do aparelho piezoelétrico da CVDentus® (CVD, São José dos Campos – SP, Brasil), utilizando a ponta w1-0. As marcações foram feitas a 2 mm de distância da borda do defeito e no centro deste para servir como referência para análise histomorfométrica (de forma a delimitar o limite ósseo da possível neoformação óssea subsequente), além de orientar o corte da peça histológica na região de interesse. Finalizou-se com a realização das suturas no tecido mole com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson) e a limpeza da região operada com solução de clorexidina 0,2%.

Após a cirurgia, administrou-se Dipirona 25mg/Kg, via IM, durante 3 dias, para alívio da dor e os animais receberam dieta normal e água “ad libitum”.

Eles foram sacrificados pela administração de uma dose tripla de mistura anestésica nos períodos de: 14, 21, 45 e 60 dias (Figura 3). Para cada período, 8 animais foram sacrificados por grupo experimental.

Figura 3 - Fluxograma representando os períodos de eutanásia

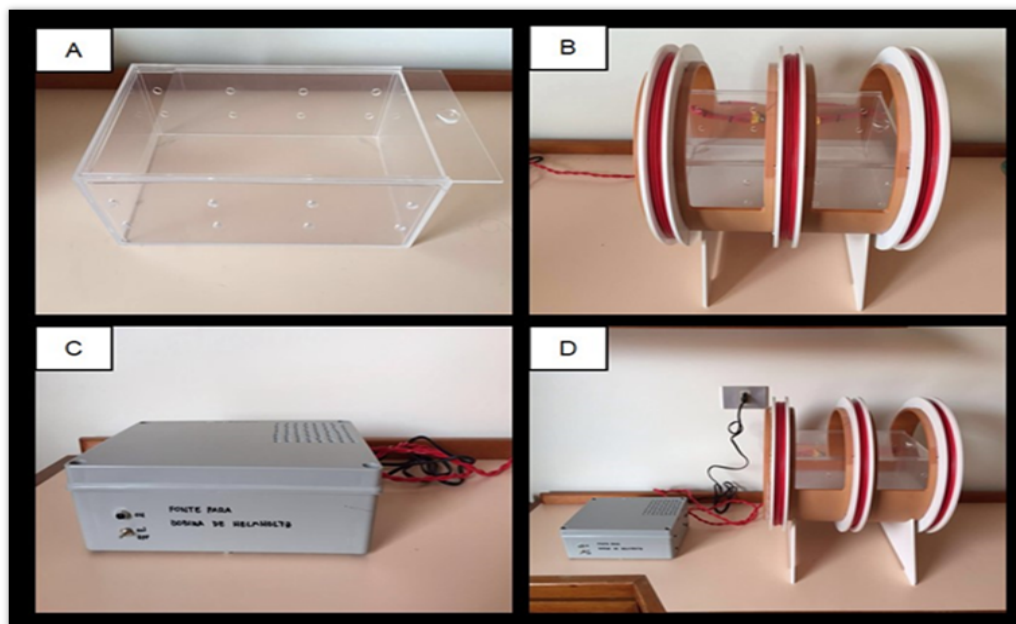


Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.4 Exposição ao Campo Eletromagnético Pulsado (CEMP)

O dispositivo de exposição do CEMP é composto por um gerador de sinal pulsátil e as bobinas de Helmholtz (Figura 4). Os ratos foram submetidos à exposição CEMP com os seguintes parâmetros fixos: 25 ciclos de -1 mTesla a + 1 mTesla em 200 microssegundos que se repetiram à taxa de 15 Hz. O tempo de duração da exposição ao CEMP foi de 1 hora (McLeod, Rubin, 1992). e de 3 horas por dia durante 5 dias da semana nos respectivos grupos: GT1h e GT3h. (Androjna et al., 2014; Midura et al., 2005) até a eutanásia dos animais.

Figura 4 - Equipamentos construídos para a geração do campo eletromagnético pulsado



Legenda: a) caixa acrílica para acondicionamento dos animais; b) bobinas de Helmholtz; c) fonte geradora do campo eletromagnético pulsado; d) conjunto formado pelas bobinas, fonte e caixa acrílica. Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.5 Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados de acordo com cada período experimental, por meio de solução anestésica em alta dosagem e, em seguida, foi feita a decapitação destes para remoção da calota. Os espécimes foram catalogado e fixados em formol a 10% por um período máximo de 48 horas. Após esse período, foram mantidos em álcool 70% para análises de tomografia computadorizada de feixe conico (TCFC). Após a realização da TCFC, iniciou-

se o processo de descalcificação em ácido fórmico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 20% (Rasouli et al., 2014) durante 20 dias. Após a descalcificação os espécimes foram incluídos em parafina.

### **3.6 Obtenção das imagens de TCFC**

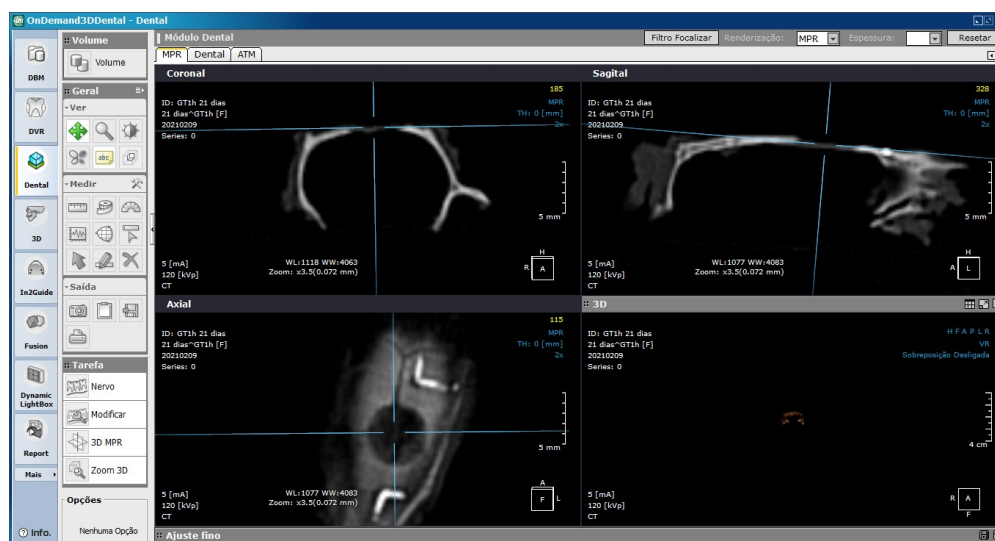
Para as aquisições de TCFC, as calotas foram estabilizadas em um suporte de isopor. As obtenções das imagens foram feitas no aparelho I-Cat Next Generation (Imaging Sciences International, Hatfield, PA, USA), com os seguintes parâmetros: campo de visão (FOV) de 8,0x8,0cm, resolução espacial (tamanho do voxel) de 0,2mm, 120kVp, 37,07mA em um tempo de aquisição de 26,9 segundos.

### **3.7 Obtenções dos cortes de TCFC para análise de textura**

Realizada as obtenções das imagens de cada calota em TCFC de todos os grupos, as imagens em seu formato DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) foram exportadas para o software OnDemand3D (Cybermed, Seul, Coreia do Sul). Neste, no módulo DENTAL elas foram visualizadas na janela MPR. Com o intuito de padronização, foram aplicados em todas as imagens o filtro focalizar (2X) e o nível e largura das janelas (WL e

WW) correspondentes ao valor pré-estabelecido para 1077 e 4083, referentes ao tomógrafo utilizado no estudo. Por meio da ferramenta corte e eixos, foram acertados os planos axial, coronal e sagital para obtenção correta da imagem na região do defeito da calota craniana, de forma que o plano axial era acertado paralelo à superfície da calota. (Figura 5).

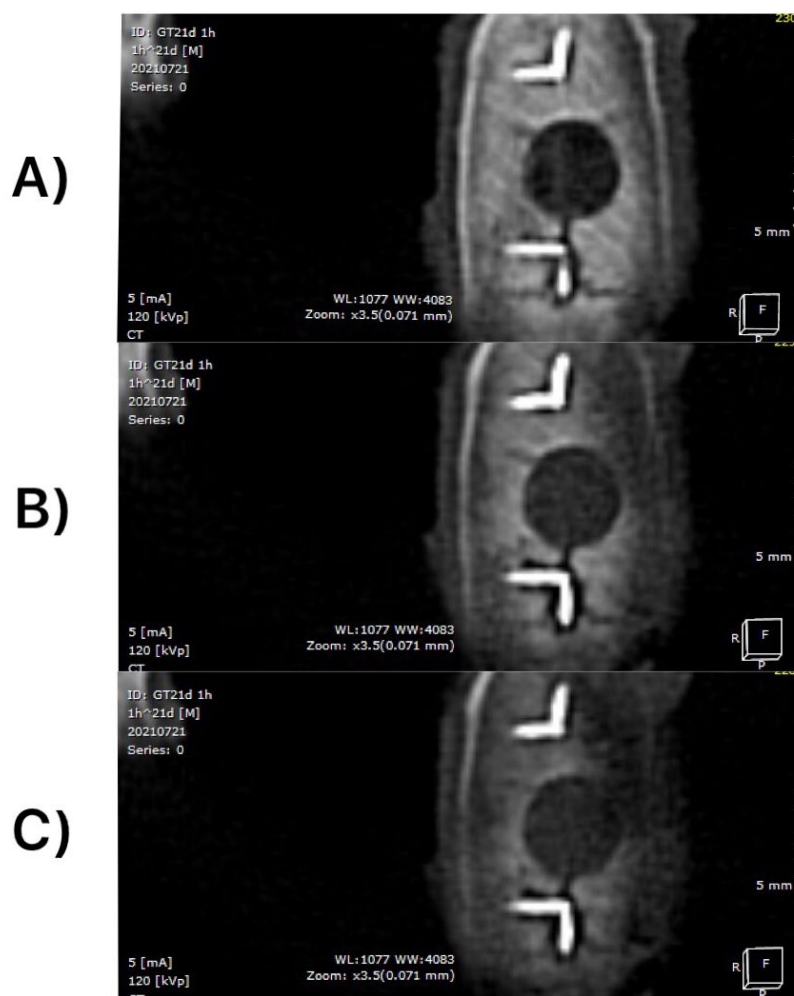
Figura 5 – Ajuste dos planos axial, coronal e sagital do defeito ósseo através do software OnDemand3D



Legenda: Visualizar no módulo Dental, na janela MPR, o ajuste dos planos axial, coronal e sagital com a finalidade de permitir que o plano axial permaneça paralelo à superfície da calota.  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram então obtidos 03 cortes axiais do defeito, sendo, um superior, outro intermediário e um inferior (Figura 6), os quais foram exportados por meio da ferramenta “captura” no formato bitmap (.bmp), para serem analisados pelo software MaZda 4.60 (Institute of Electronics, Technical University of Lodz, Polônia), com intuito da obtenção dos parâmetros de análise de textura do defeito ósseo.

Figura 6 – Obtenção dos três cortes axiais do defeito através do software OnDemand3D



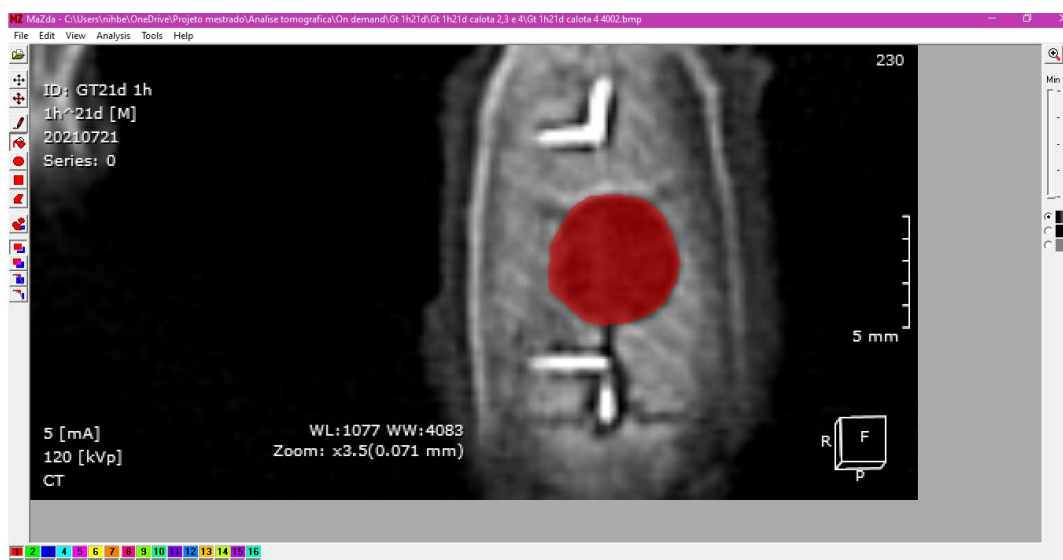
Legenda: A) Corte axial obtido na região mais superior do defeito ósseo; B) Corte axial obtido na região mais intermediária do defeito ósseo; C) Corte axial obtido na região mais inferior do defeito ósseo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para análise de textura das imagens foi utilizado o software MaZda 4.60 (Institute of Electronics, Technical University of Lodz, Polônia), que consiste em um pacote específico com finalidades para análise de textura de imagem.

Cada corte axial obtido previamente em seu formato bitmap, foi exportado para o software MaZda 4.60 e então, por meio da ferramenta “*draw polygon*”, delimitou-se a região de interesse (ROI), correspondente ao defeito ósseo, a ser analisada pelo software (Figura 7).

Figura 7 - Delimitação da região de interesse (ROI) no plano axial da calota craniana através do software Mazda para análise de textura do defeito



Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise de textura é baseada na chamada Matriz de Co-ocorrência (COM), a qual fornece informações sobre a relação espacial entre os pixels componentes da imagem e que estão contidos na ROI, determinada pelo operador. O software MaZda 4.60 é capaz de efetuar variações nas coordenadas na relação espacial dos elementos componentes dessa matriz e assim determinar a frequência de diferentes informações a respeito dos valores de pixel analisados. Para tal, o software possibilita que sejam selecionados parâmetros

específicos, os quais tem um significado de interpretação que traduzirá o comportamento daquele tecido analisado, fornecendo assim os valores para análise de textura. Os parâmetros de textura – relativos a COM - a serem analisados foram selecionados na janela “Opção de Análise”. Assim, neste estudo, foram analisados os seguintes parâmetros calculados da COM, definidos por Haralick et al. (1973):

- a) momento angular secundário (*AngScMom*) - mede a uniformidade (ou ordem) da distribuição dos níveis de cinza da imagem. As imagens com menor número de níveis de cinza têm maior uniformidade.
- b) contraste (*Contrast*) - representa a quantidade de variação local dos níveis de cinza. Um valor elevado deste parâmetro pode indicar a presença de bordas, ruídos ou rugas na imagem;
- c) correlação (*Correlat*) – mede a dependência linear dos níveis de cinza entre pixels vizinhos. Fornece uma medida similar aos métodos de autocorrelação;
- d) soma dos Quadrados (*SumOfSqs*) – medida da dispersão (em relação à média) da distribuição dos níveis de cinza (variância);
- e) momento da Diferença Inversa (*InvDfMom*) – mede a suavidade (homogeneidade) da distribuição dos níveis de cinza da imagem. Se o valor do contraste é baixo o valor do *InvDfMom* é alto;
- f) entropia da Soma (*SumEntrp*) – medida da dispersão (em relação à média) da distribuição da soma dos níveis de cinza da imagem;
- g) entropia (*Entropy*) – mede o grau de desordem entre os pixels na imagem, é o inverso do *AngScMom*. As imagens com maior número de níveis de cinza têm maior entropia;
- h) soma das médias (*SumAverg*) – mede a distribuição dos níveis de cinza, um maior valor traduz uma imagem com menos uniformidade;

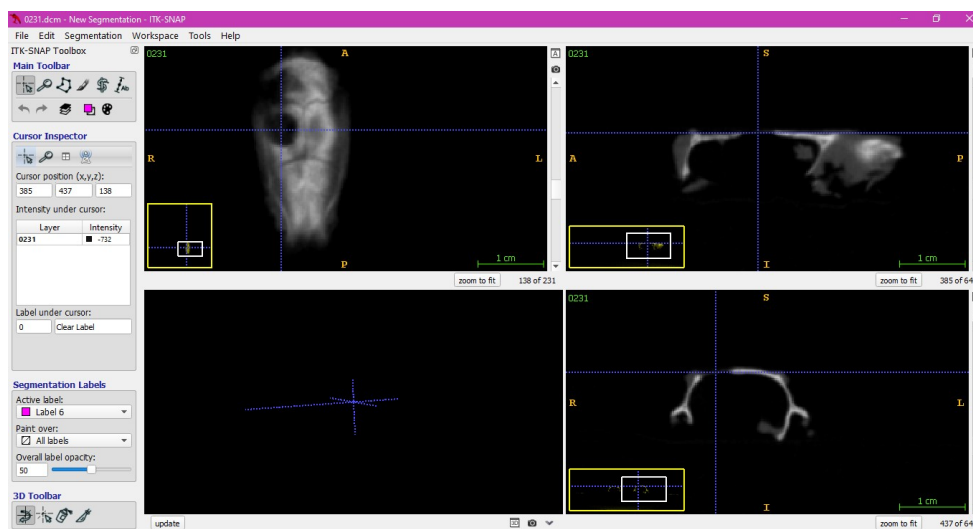
- i) soma das variâncias (*SumVarnc*) – mede a dispersão da distribuição dos níveis de cinza, um maior valor suscita em uma imagem menos uniforme;
- j) diferença das variâncias (*DifVarnc*) – mede o grau de espalhamento dos tons de cinza, um maior valor traduz uma imagem menos uniforme;
- k) diferença da entropia (*DifEntrp*) – assim como a entropia, mede o grau de desordem entre os pixels na imagem, porém de uma forma mais generalizada. Um maior valor corresponde a uma imagem de menor uniformidade.

Os valores dos parâmetros obtidos pela análise de textura, para cada corte, foram tabulados e para cada parâmetro foi feita uma média dos três cortes obtidos. Este valor médio corresponde ao valor analisado, isto foi realizado com o intuito de se obter valores que abranjam uma área maior da imagem correspondente ao defeito ósseo em cada calota.

### **3.8 TCFC para análise de volume**

Para análise dos volumes de cada defeito, todas as imagens de TCFC, em seu formato DICOM foram exportadas para o software ITK-Snap<sup>®</sup> (Kitware, New York, USA). Neste software, a região do defeito foi isolada, por meio da ferramenta ROI, utilizando-se os três planos em MPR: axial, coronal e sagital. (Figura 8).

Figura 8 – Visualização do defeito ósseo nos três planos: axial, coronal e sagital no software ITK-Snap®



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, por meio da ferramenta de segmentação semiautomática, foi identificada então, pela tela de *Thresholding*, a estrutura para segmentação – o defeito ósseo – e, em seu interior, foram implantadas sementes (ou bolhas) para o progressivo, preenchendo toda a sua estrutura (Figura 9).

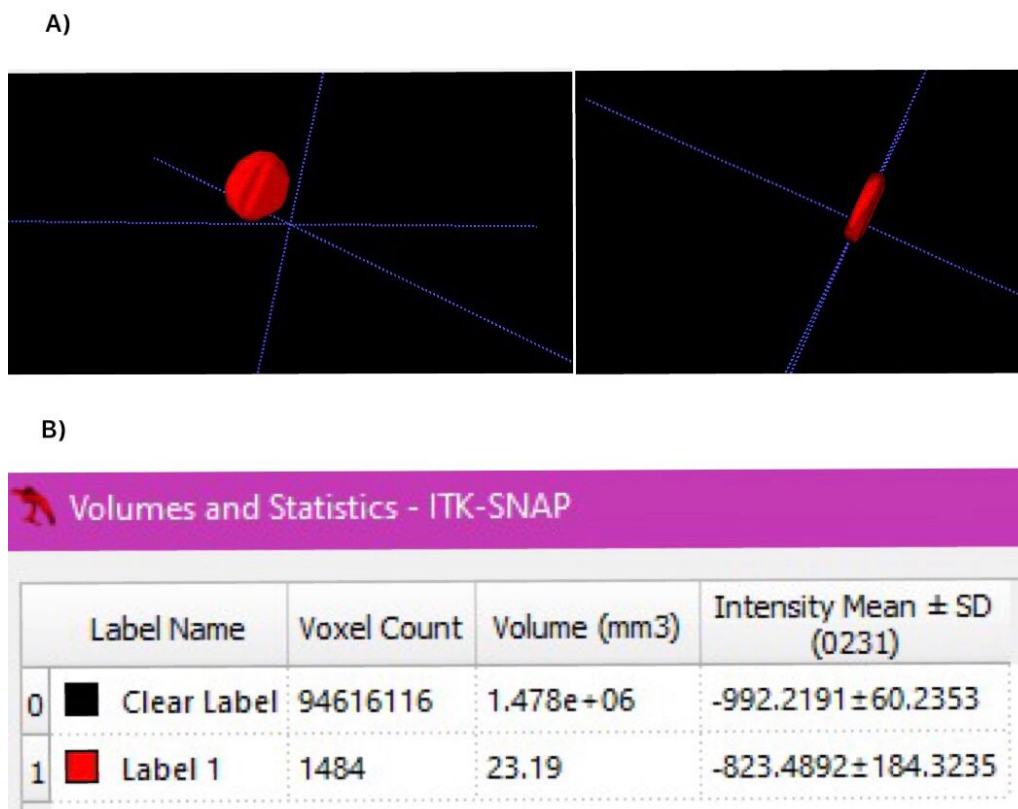
Figura 9 - Delimitação e preenchimento do ROI no software ITK-Snap®



Fonte: Elaborada pelo autor.

Findo o processo de segmentação, o software gerará um modelo tridimensional (3D) e uma tabela na qual será exibida a volumetria em  $\text{mm}^3$  desta estrutura (Figura 10).

Figura 10 – Modelo tridimensional do defeito ósseo e volumetria em  $\text{mm}^3$  gerado pelo software ITK-Snap<sup>®</sup>



Legenda: A) Modelo tridimensional do defeito ósseo gerado após delimitação e preenchimento da ROI; B) Tabela com a volumetria em  $\text{mm}^3$  do modelo tridimensional.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.9 Processamento histológico

Cada fragmento foi incluído, no sentido da superfície de corte, em bloco de parafina e os cortes foram obtidos de forma seriada com  $5\mu\text{m}$  de espessura, somando um total de dez lâminas com 10 cortes por bloco que foram submetidos a processamento histológico de rotina. A coloração utilizada foi

Hematoxilina e Eosina (HE – Merck &Co, Inc.) e a análise histológica e histomorfométrica realizadas em microscopia de luz.

A análise microscópica foi feita através da captura de imagens das lâminas a partir de um microscópio de luz Axiophot2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCamMRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2.

As imagens foram capturadas e cegadas (MANJ) e posteriormente foram analisadas por outro examinador devidamente calibrado (NBM). As medidas de duas análises da mesma estrutura, foram submetidas ao teste Intraclasse (ICC) e o examinador foi considerado calibrado até que ele atingisse 90% de concordância entre os exames.

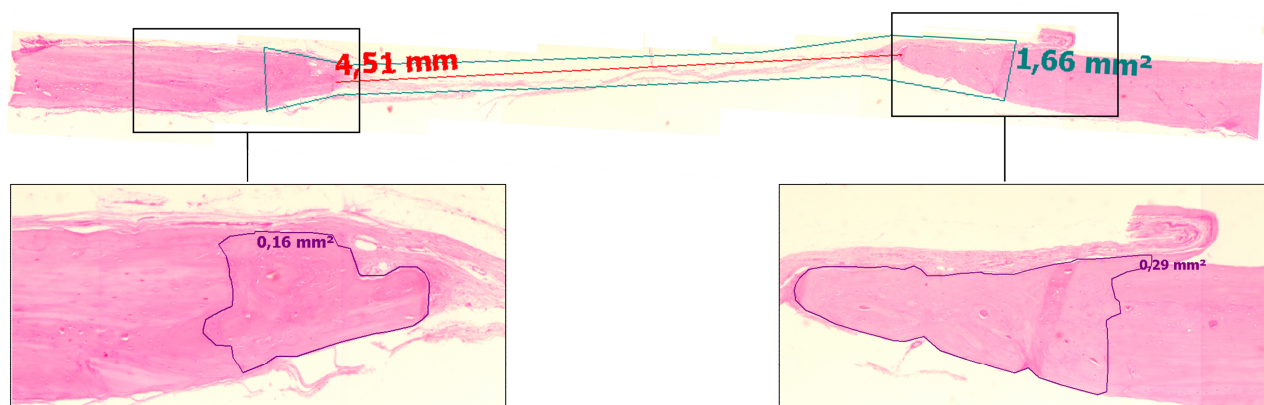
A análise foi realizada inicialmente em pequeno aumento para ter uma visibilidade global dos cortes e posteriormente ampliada para observar os detalhes de cada área e assim realizar uma análise quantitativa do tecido ósseo. As medidas histomorfométricas foram feitas a partir de fotomicrografias obtidas por meio do programa computacional AxioVision Release 4.7.2.

#### Parâmetros histomorfométricos:

Para as análises dos parâmetros histomorfométricos (Figura 11), inicialmente foi medida a área original total (AT) do tamanho do defeito. Para tal, primeiramente foram identificadas as superfícies externas e internas do defeito da calota bem como as linhas de reversão direita e esquerda onde a trefina removeu o osso, com distância total de 5mm. A área interna a essas linhas era a área do defeito.

- a) área de neoformação óssea (ANO): Foram medidas as áreas de nova formação de osso a partir das bordas direita e esquerda do defeito;
- b) área remanescente do defeito (ARD): Foi obtida pela  $AT - ANO$ ;
- c) distância entre os bordos de osso neoformado (LINEAR).

Figura 11 - Esquema ilustrativo da análise histomorfométrica



Legenda: Área em azul representa a área total do defeito (AT) em  $\text{mm}^2$ ; a linha vermelha representa a medida LINEAR em mm; as duas imagens inferiores esquerda e direita representam o maior aumento da região e mostram a medida da área (em roxo) em  $\text{mm}^2$  dos bordos de osso neoformado (ANO).

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.10 Análise estatística

Os dados histomorfométricos foram submetidos à análise estatística por

meio dos programas computacionais Minitab (Minitab® 18.1) e GraphPad Prism (Versão 6.01). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk e no caso de serem paramétricos, a análise descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão e a estatística inferencial foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, a fim de verificar as diferenças estatísticas. Já para os dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunn foram realizados. Em ambos os casos o nível de significância adotado foi de 5%.

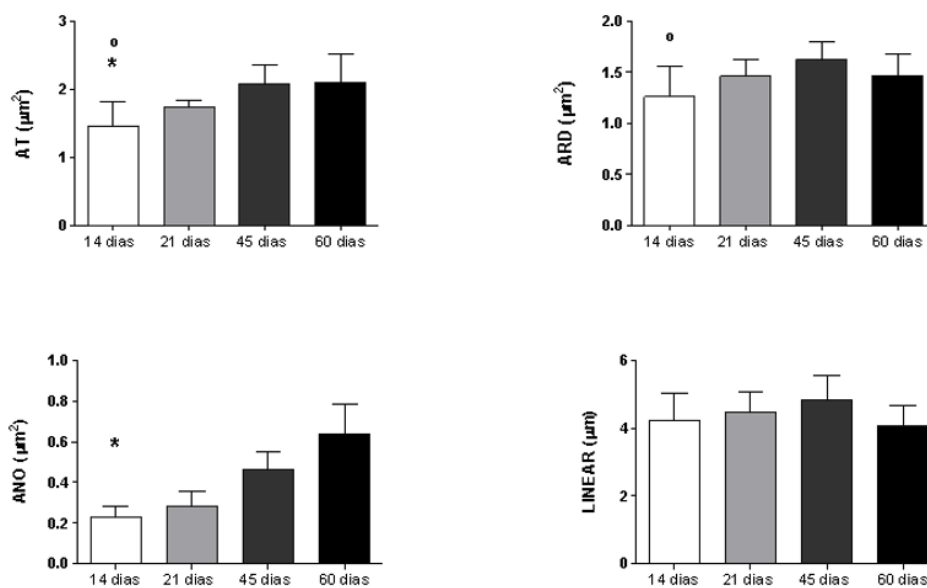
Com relação às análises estatísticas das imagens de TCFC, foi realizada a análise exploratória de dados através de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e construção de gráficos. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para avaliar a correlação entre as variáveis de textura e selecionar as variáveis para análise. Para comparar tempos e grupos foram usados modelos de ANOVA considerando Grupo, Tempo e interação entre Grupo e Tempo como fontes de variação. Nos modelos em que o p-valor da interação foi significativo, foi construído um modelo para cada grupo, comparando os tempos e outro modelo para cada tempo comparando os grupos. Nesses casos os p-valores foram ajustados pelo método de Bonferroni. Como as variáveis não apresentaram distribuição normal, tanto o volume quanto os parâmetros de textura foram transformados em postos (ranks) nos modelos de ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5%.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Análise histomorfométrica intragrupo**

Os resultados da análise histomorfométrica intragrupo do grupo controle revelaram que, para a variável AT, houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 14 dias com 45 e 60 dias. Já para a ANO, pôde-se observar uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 14 dias com 60 dias. Com relação a ARD, houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 14 dias com 45 dias. Por fim, na variável LINEAR não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os tempos nesse grupo (Figura 12).

Figura 12 – Comparações intragrupo do Grupo Controle (GC)

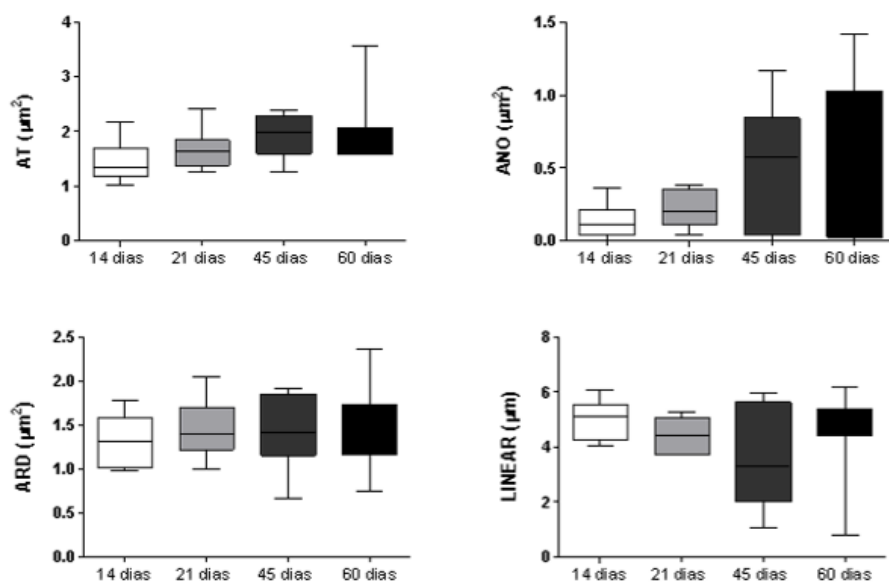


Legenda: Comparações intragrupos do GC nos diferentes períodos para as variáveis estudadas: AT; ANO; ARD; e LINEAR. One way – ANOVA, Teste Tukey  $p < 0.05$ . \* 60 dias e  $\circ$  45 dias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já em GT1h, as variáveis AT, ANO, ARD e LINEAR não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tempos estudados (Figura 13).

Figura 13 – Comparações intragrupo do grupo GT1h

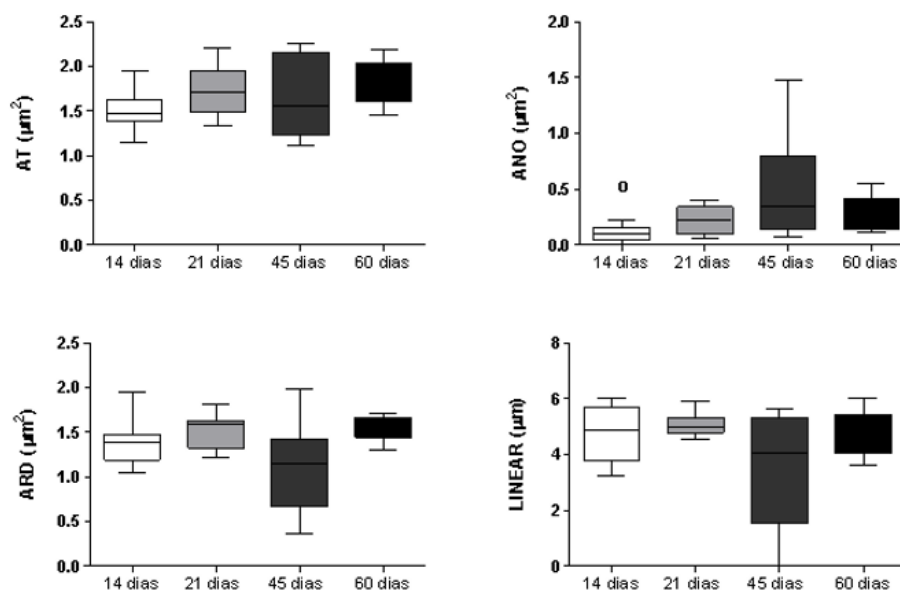


Legenda: Comparações intragrupos de GT1h nos diferentes períodos para as variáveis estudadas: AT; ANO; ARD; e LINEAR. Teste de Kruskal-Wallis  $p > 0.05$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

No GT3h, as variáveis AT, ARD e LINEAR não apresentaram diferença estatisticamente significativa, já na variável ANO é possível observar diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 14 dias com 45 dias (Figura 14).

Figura 14 - Comparações intragrupo do grupo GT3h



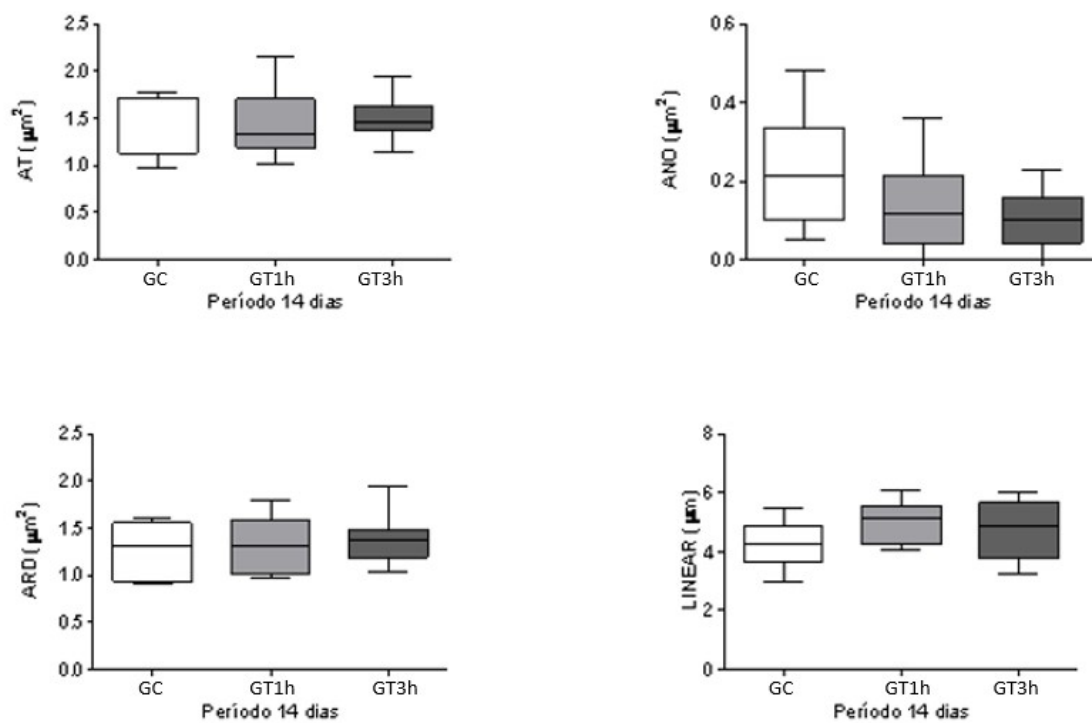
Legenda: Comparações intragrupos do GT3h. Kruskal-Wallis, Dunn's teste  $p < 0.05$ .  $\circ$  45 dias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 Análise histomorfométrica intergrupo

A análise histomorfométrica intergrupos, realizada pelo teste de Kruskal - Wallis, revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos nos quatro períodos estudados (Figuras 15, 16, 17, 18).

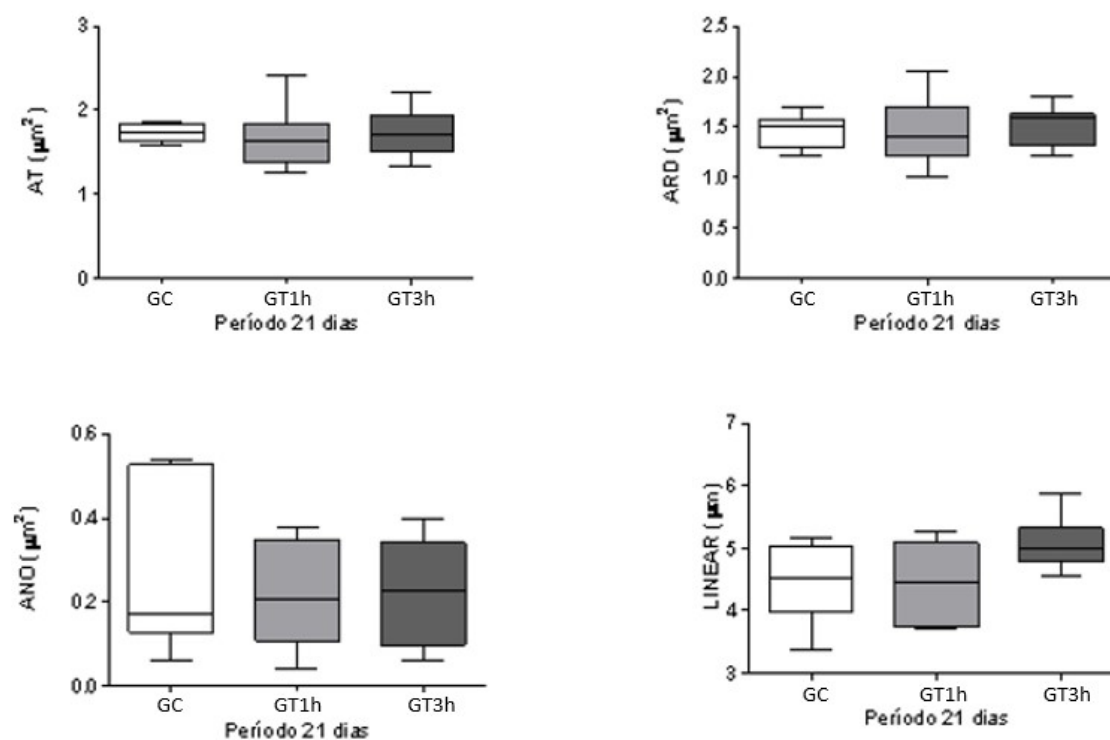
Figura 15 - Comparações intergrupos no período de 14 dias



Legenda: Comparações intergrupos para as variáveis AT, ANO, ARD e LINEAR no período de 14 dias. Teste de Kruskal-Wallis  $p > 0.05$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

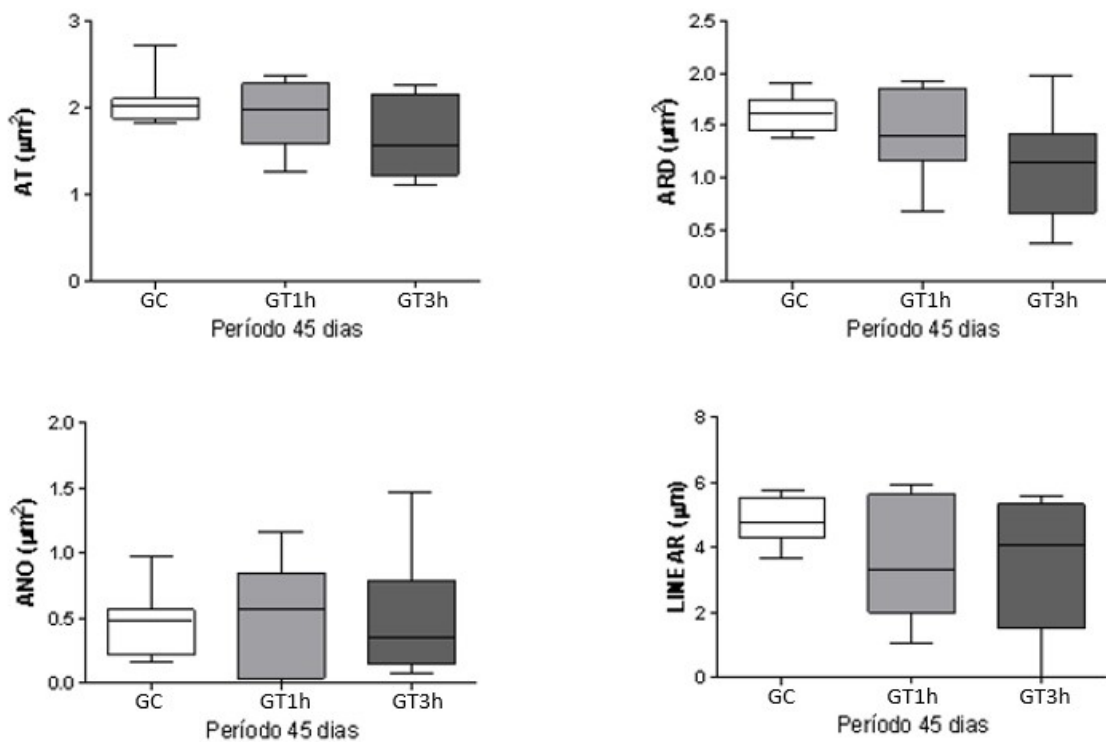
Figura 16 – Comparações intergrupos no período de 21 dias



Legenda: Comparações intergrupos para as variáveis AT, ANO, ARD e LINEAR no período de 21 dias. Teste de Kruskal-Wallis  $p > 0.05$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

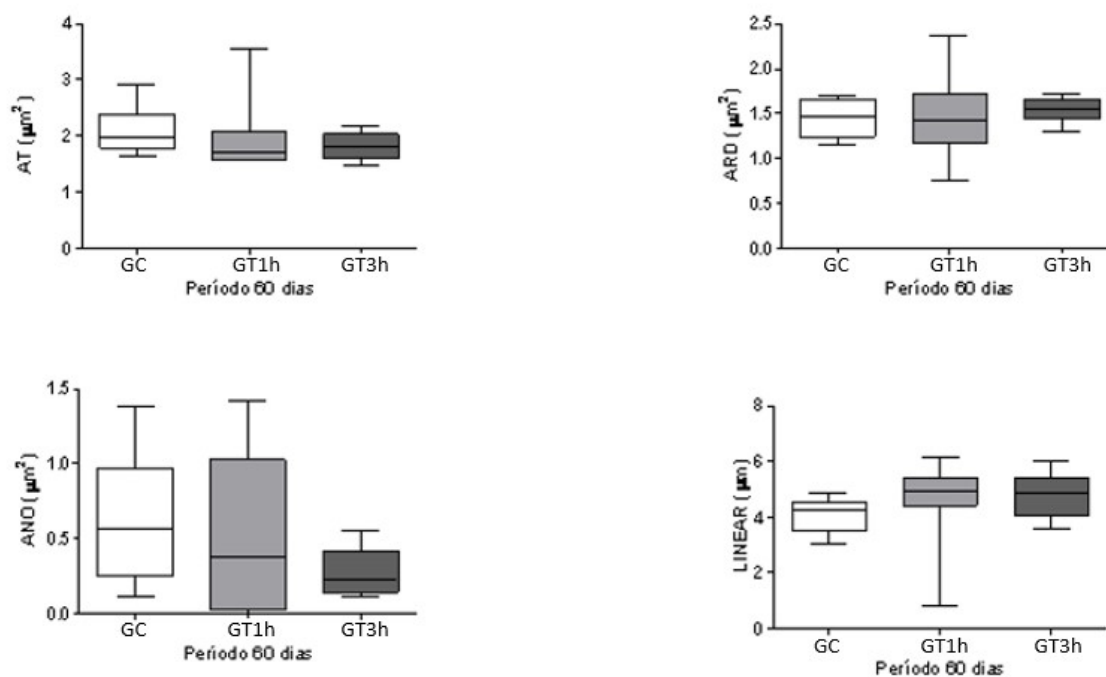
Figura 17 – Comparações intergrupos no período de 45 dias



Legenda: Comparações intergrupos para as variáveis AT, ANO, ARD e LINEAR no período de 45 dias. Teste de Kruskal-Wallis  $p > 0.05$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 – Comparações Intergrupos no período de 60 dias



Legenda: Comparações intergrupos para as variáveis AT, ANO, ARD e LINEAR no período de 60 dias. Teste de Kruskal-Wallis  $p > 0.05$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 4.3 Análises das Imagens TCFC

Em relação à AT das imagens de TCFC, a princípio foram selecionados 11 parâmetros em 12 direções distintas, totalizando assim 132 variáveis. Além das variáveis relativas aos parâmetros de AT, estudou-se adicionalmente a

variação do volume dos defeitos ósseos, totalizando assim 133 variáveis. Devido a este alto número de variáveis, e, conseqüentemente à maior quantidade de testes estatísticos, o erro da análise final seria aumentado, e, portanto, foi considerada a opção de reduzir o número total dessas variáveis. Para tal, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman entre as diferentes direções de um mesmo parâmetro de AT e entre aqueles dentro da direção S(1,0) (apêndice A).

No apêndice A é possível observar que há correlação muito forte entre as direções de um mesmo parâmetro de textura, com exceção do parâmetro *Correlat* (Correlação). Sendo assim, concluiu-se que as informações obtidas em uma direção são as mesmas que aquelas nas demais direções, desta forma, as comparações foram realizadas apenas em 01 direção (S1,0)), evitando-se assim maiores possibilidade de erro das análises.

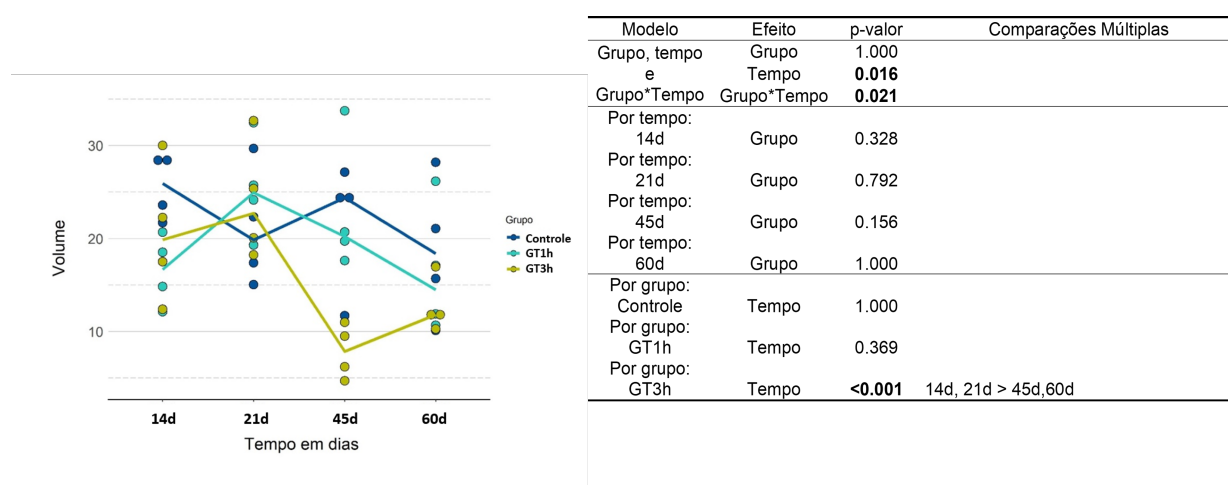
Quando se observa o gráfico L do apêndice A, observa-se que há alta correlação entre alguns dos parâmetros de textura dentro da direção S(1,0). Considerou-se que parâmetros de textura com correlações de Spearman maiores ou iguais a 0,8 ou menores ou iguais a -0,8 são fortemente correlacionados e, portanto, fornecem a mesmas informações para comparações dos grupos (Controle, GT1h e GT3h) e os tempos considerados (14d, 21d, 45d e 60d). Sendo assim, optou-se por realizar as análises apenas com os seguintes parâmetros de textura: *Contrast* S(1,0); *SumAverg* S(1,0); *Entropy* S(1,0) e todas as direções do *Correlat*.

Desta forma, serão apresentados os resultados relativos à análise do volume e demais parâmetros considerados - citados anteriormente – de forma que, para cada parâmetro, haverá 01 figura e 01 apêndice, que mostram as medidas descritivas relativas a aquela variável (parâmetro) de cada grupo e cada tempo considerado; além disso, a figura também apresentará informações

relativas aos resultados de comparação entre grupos e tempos. Quando foi observada a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos ou tempo, foi então realizada a comparação múltipla e os resultados também foram apresentados nesta figura.

O Apêndice B e a figura 19 exibem os resultados relativos ao volume dos defeitos ósseos.

Figura 19 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para os volumes dos defeitos ósseos. P-valor dos efeitos por modelo para os volumes

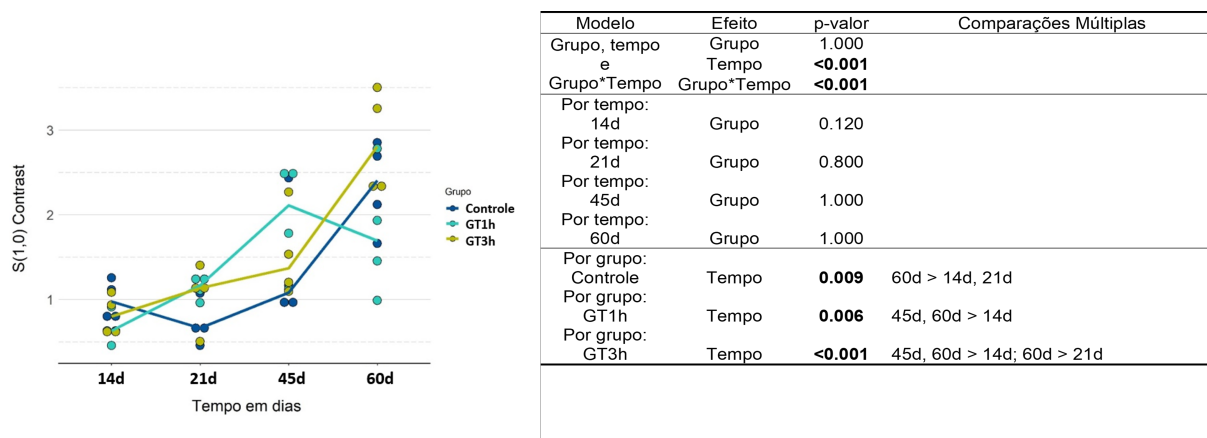


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os volumes dos defeitos, foi observada interação significativa entre grupo e tempo, portanto a comparação foi realizada por grupo e por tempo. Comparando os grupos em cada tempo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos tempos. Comparando os tempos por grupo, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tempos do grupo GT3h. Os tempos 14d e 21d apresentaram volumes maiores que os tempos 45d e 60d.

O Apêndice C e a Figura 20 exibem os resultados relativos ao parâmetro de textura *Contrast S(1,0)*.

Figura 20 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Contrast S(1,0)*. P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro

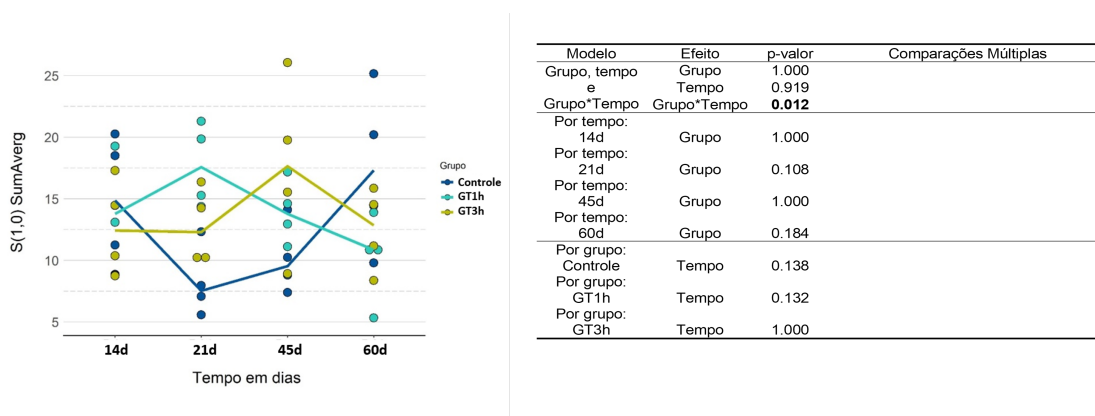


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o parâmetro de textura *Contrast* S(1,0), foi observada interação significativa entre grupo e tempo, portanto a comparação foi realizada por grupo e também por tempo. Comparando os grupos em cada tempo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos tempos. Comparando os tempos por grupo, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tempos nos três grupos. No grupo Controle o tempo 60d apresentou maior valor que os tempos 14d e 21d. No grupo GT1h os tempos 45d e 60d apresentaram maiores valores que o tempo 14d. No grupo GT3h os tempos 45d e 60d apresentaram maiores valores que o tempo 14d e o tempo 60d apresentou maior valor que o tempo 21d.

O Apêndice D e a Figura 21 exibem os resultados relativos ao parâmetro de textura *SumAverg* S(1,0).

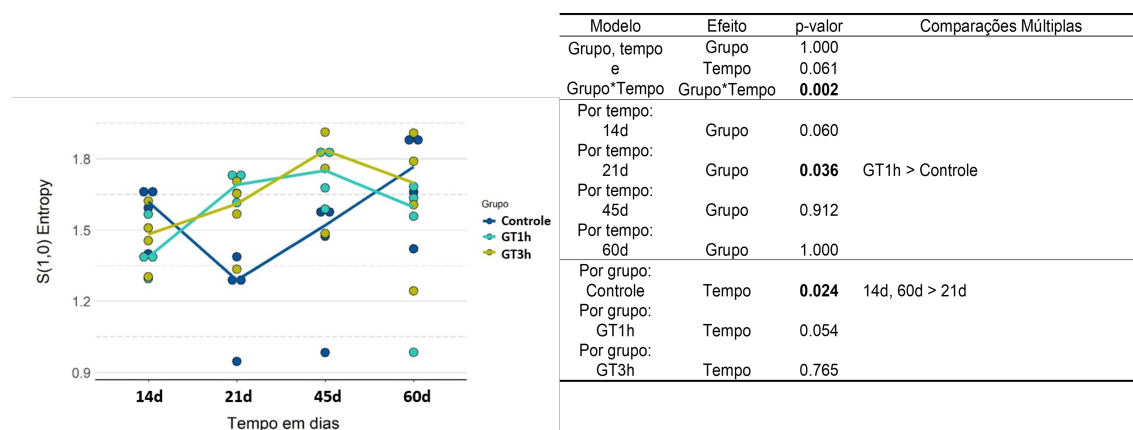
Figura 21 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *SumAverg* S(1,0). P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



Fonte: Elaborada pelo autor.

O Apêndice E e a Figura 22 exibem os resultados relativos ao parâmetro de textura *Entropy*  $S(1,0)$ .

Figura 22 - Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Entropy*  $S(1,0)$ . P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro

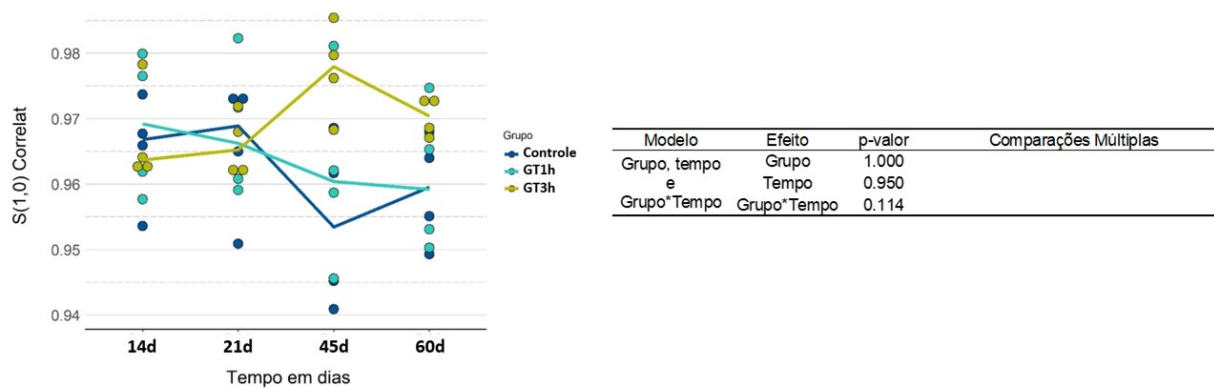


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o parâmetro de textura *Entropy*  $S(1,0)$ , foi observada interação significativa entre grupo e tempo, portanto a comparação foi realizada por grupo e também por tempo. Comparando os grupos em cada tempo, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos no tempo 21d. O grupo GT1h apresentou maior valor que o Grupo Controle. Comparando os tempos por grupo, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tempos no Grupo Controle. Os tempos 14d e 60d apresentaram maior valor que o tempo 21d.

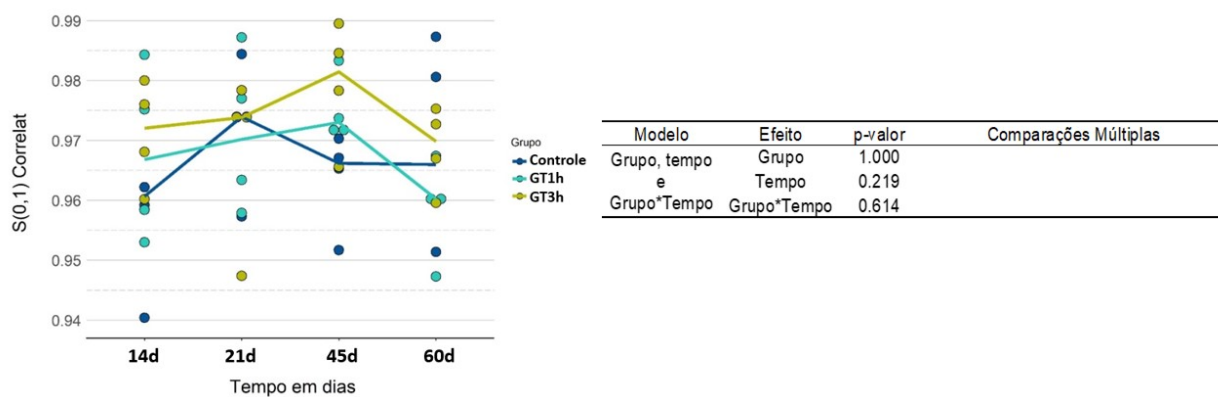
Os Apêndices F a O e a Figuras 23 a 32 exibem os resultados relativos ao parâmetro de textura *Correlat*  $S(1,0)$ ,  $S(0,1)$ ,  $S(1,1)$ ,  $S(1,-1)$ ,  $S(2,0)$ ,  $S(0,2)$ ,  $S(2,2)$ ,  $S(2,-2)$ ,  $S(3,0)$ ,  $S(0,3)$ ,  $S(3,3)$ ,  $S(3,-3)$ , progressivamente.

Figura 23 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat*  $S(1,0)$ . P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



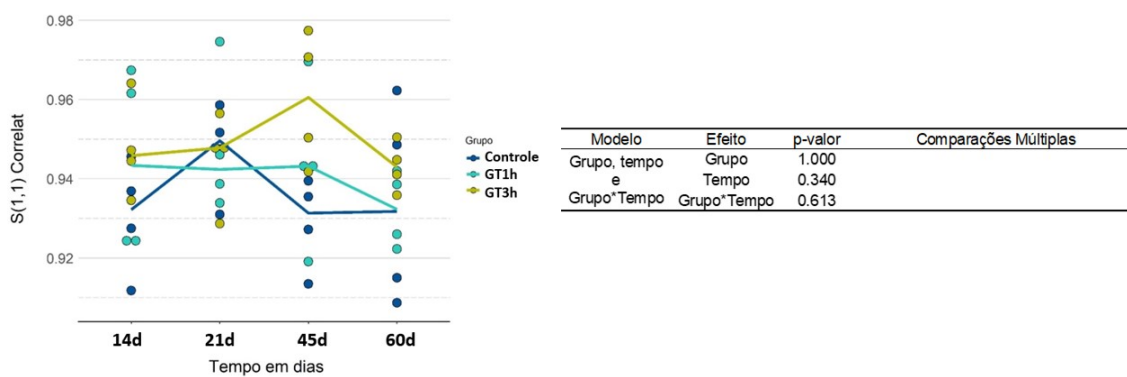
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(0,1)*. P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



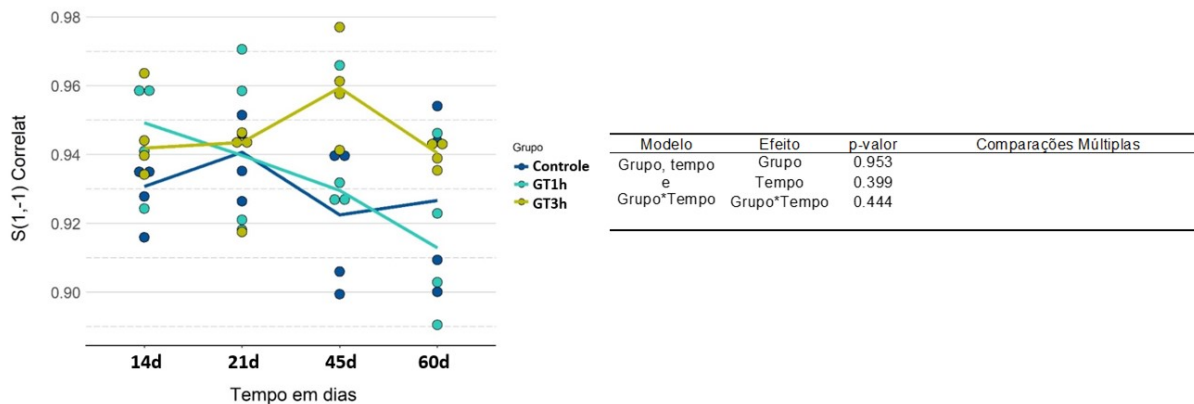
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(1,1)*. P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



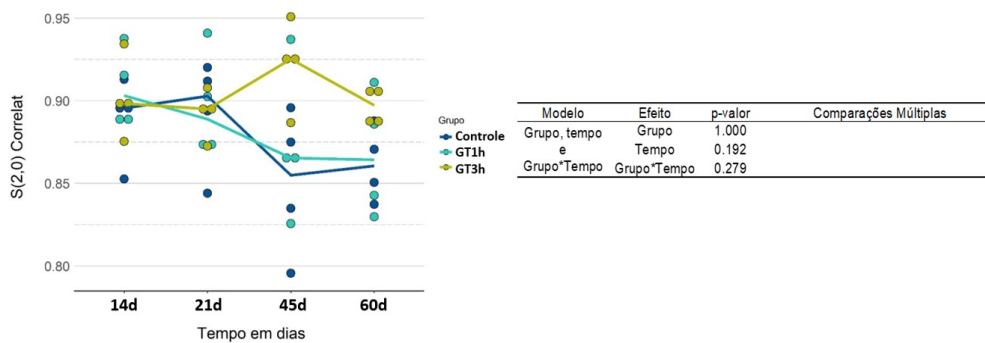
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(1,-1)*. P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro de textura



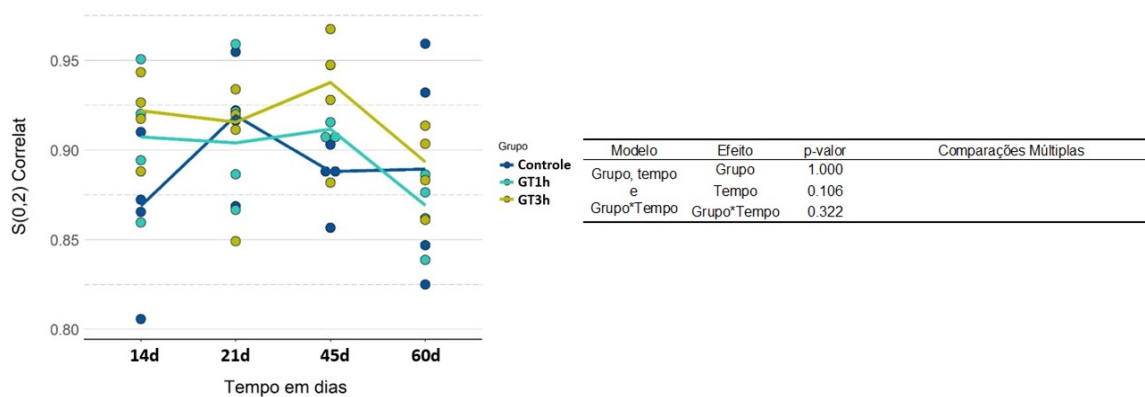
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 27 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(2,0)*. - P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



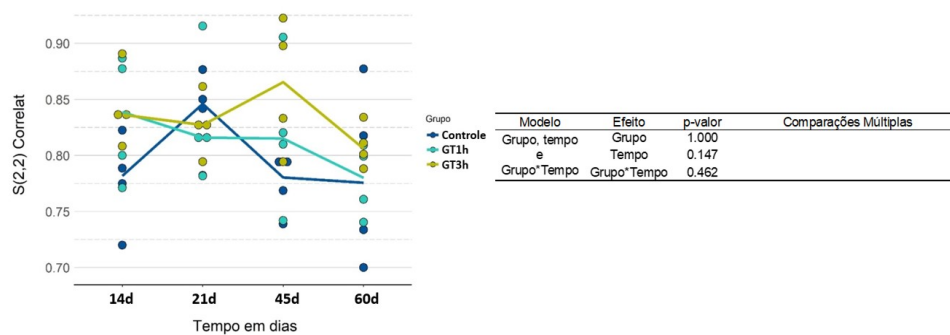
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 28 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(0,2)*. P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



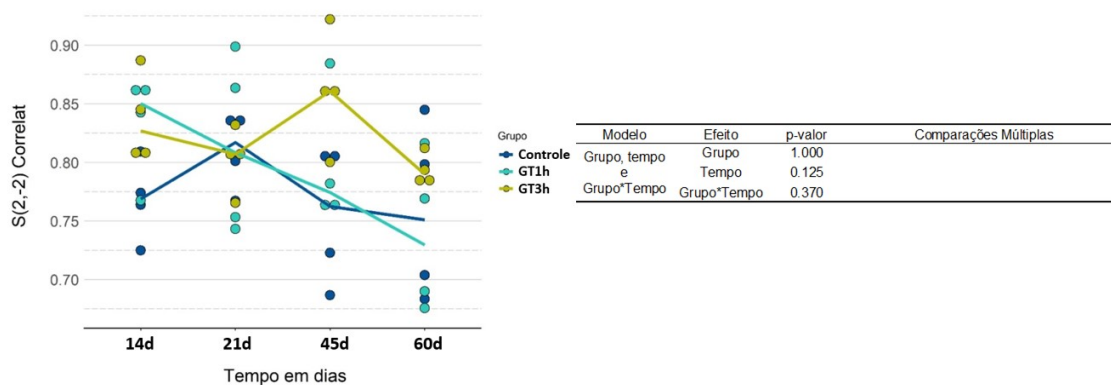
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(2,2)*. P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



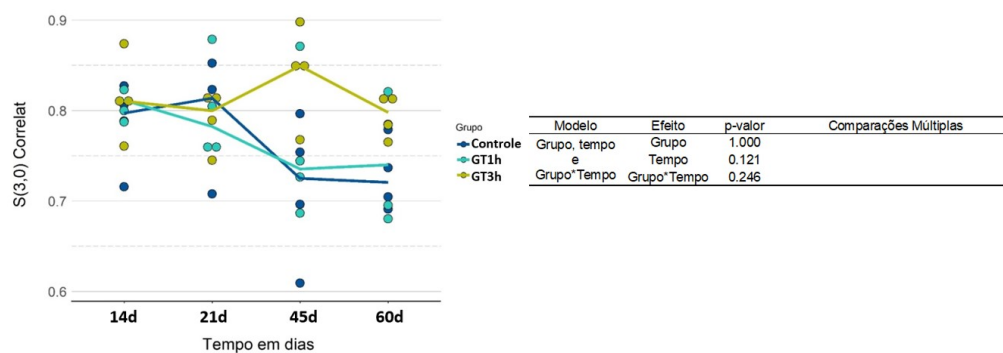
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 30 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(2,-2)*. P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro de textura



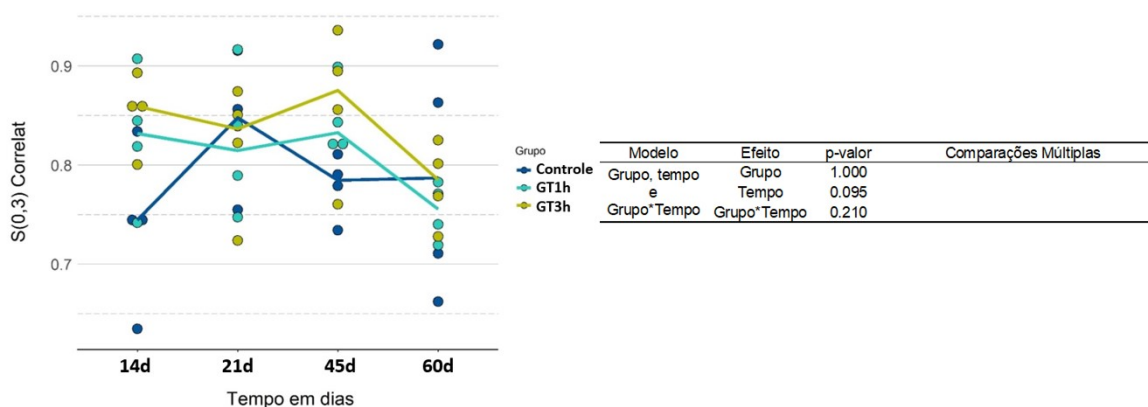
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31 – Gráfico com medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(3,0)*. P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 32 – Gráfico com a medida individual de cada animal (pontos) e mediana (linha) por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat* S(0,3). P-valor dos efeitos por modelo para o mesmo parâmetro



Fonte: Elaborada pelo autor.

No caso do parâmetro de textura *Correlat* não foi observada diferença significativa entre os grupos e entre os tempos, considerando todas as direções.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a eficácia de dois protocolos com diferentes tempos de aplicação do CEMP no reparo ósseo em um modelo de defeito crítico na calvária de ratos. Estes animais, no contexto de estudos relacionados ao CEMP, são os principais alvos de investigação nessa área devido a sua acessibilidade e versatilidade, uma vez que apresentam um baixo custo, fácil manuseio e o seu metabolismo ósseo é semelhante ao dos humanos. Além disso, devido ao seu pequeno tamanho, são facilmente colocados em gaiolas para exposição ao CEMP. Assim, no contexto de estudos em degeneração e reparo ósseo, múltiplos cenários podem ser realizados: como osteotomias iatrogênicas; dano ósseo por alteração metabólica ou desuso (Di Bartolomeo et al., 2022). Com isso, diferentes propostas de estudos e seus respectivos efeitos biológicos relacionados ao CEMP podem ser investigados através desse modelo animal.

Com relação aos defeitos ósseos, ossos longos e da calvária vem sendo amplamente utilizados na literatura em pesquisas de defeitos ósseos críticos (Huang et al., 2022), porém a calota apresenta algumas vantagens em relação aos primeiros: esta praticamente não sofre ação de forças exógenas (Murphy et al., 2017) e não requer nenhum método de estabilização (Huang et al., 2022). Apesar da sua ampla investigação na literatura com relação ao reparo de defeitos ósseos críticos, pouco se sabe a respeito do efeito dos CEMPS na região da calvária e, portanto, deve ser melhor explorada em futuros estudos.

Os mecanismos de ação dos CEMPS ainda estão em debate na literatura, mas vários artigos relatam que estes, devido a oscilação do campo eletromagnético exógeno, promovem mudanças na função celular ao induzirem uma maior entrada de íons na membrana celular (Mansourian et al., 2021). Isso

ocorre por meio da ativação/expressão de receptores de superfície celular e modulação de diversas vias de transdução de sinais essenciais para a osteogênese e angiogênese, incluindo as vias de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; Wnt/ $\beta$ -catenina; proteína quinase ativada por mitose (MAPK); fator de crescimento fibroblástico (FGF); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (Yuan et al., 2018), levando assim à alterações nos parâmetros fisiológicos de diferenciação, proliferação e mineralização das células ósseas por meio desses fatores de crescimento e componentes intracelulares (He et al., 2018).

Apesar de diversos estudos terem demonstrado um grande potencial dos CEMPS no tratamento de reparos ósseos (Lin et al., 2020; Qiu et al., 2020; He et al., 2018) no presente estudo não foi possível demonstrar um potencial benefício da utilização destes, confirmado tanto histologicamente quanto tomograficamente. A análise histomorfométrica intergrupo revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam a terapia com CEMP e o GC em todos os períodos e para todas as variáveis estudadas. Uma possível explicação para esse resultado seria a escolha dos parâmetros relacionados ao dispositivo do CEMP (frequência, intensidade, formato da onda e duração da exposição), pois as características e diferentes combinações desses parâmetros parecem exercer um grande papel no tipo de resposta biológica gerada (Hiie et al., 2018). De fato, a literatura mostra uma grande heterogeneidade entre as metodologias utilizadas e padrões relacionados aos CEMPs. A falta de um protocolo padrão ouro, que maximizaria os potenciais efeitos dos CEMP no reparo ósseo, poderia explicar a alta variabilidade na eficácia dessa modalidade de tratamento em diversos estudos.

Um estudo que exemplifica bem essa variabilidade dos resultados é o de Midura et al. (2005), que avaliaram o reparo ósseo de uma osteotomia fibular de tamanho crítico em quinze ratos, os quais foram divididos em dois grupos distintos caracterizados por diferentes frequências e intensidades de campo eletromagnético aplicadas. No primeiro grupo, a frequência adotada foi de 15 Hz e campo eletromagnético de 2 mT (sinal Physio-Stim); já no segundo grupo, uma frequência de 1,5 Hz e um campo magnético induzido de 0,02 mT (sinal Osteo-Stim) foram implementados. A duração da exposição foi de 3h/dia durante 7 dias por semana. O membro contra-lateral foi utilizado como controle em ambos os grupos. Os resultados mostraram um melhor preenchimento e consolidação óssea no grupo tratado com Physio-Stim, o que não foi observado para o grupo Osteo-Stim. Assim, pode-se deduzir que diferentes tipos de campos eletromagnéticos exercem efeitos distintos sobre a cicatrização óssea.

Outro estudo que mostra essa relação entre os parâmetros relacionados ao CEMP e o seu efeito biológico é o conduzido por Liu et al. (2021). Eles avaliaram os mecanismos de reparo do defeito ósseo em fêmur de ratos, os quais foram submetidos à estimulação com CEMP sob uma frequência de 15 Hz por 2 h/dia por 7 dias. Os animais foram divididos em três grupos, diferindo nas intensidades do campo eletromagnético aplicadas (1 mT, 5 mT e 10 mT), além do grupo controle. Os resultados mostraram um aumento significativo na densidade mineral óssea após 21 dias apenas nos animais tratados com intensidades de 5 mT e 10 mT, sugerindo que este parâmetro também pode ter uma grande influência na taxa de deposição óssea.

Além disso, outro fator que pode afetar as respostas biológicas à terapia com CEMPs seria o tipo celular. Numa revisão sistemática e meta análise recente de estudos *in vitro* (Mansourian et al., 2021), os resultados mostraram que quase 50% das células humanas sofreriam alterações quando expostas aos

CEMPs, enquanto um menor número de células em ratos/camundongos e outras espécies sofreram essa influência. Dessa maneira, enquanto algumas células parecem bem sensíveis à terapia com CEMP, outras se mostram indiferentes ao estímulo. Além disso, praticamente não há estudos in vivo de defeito de calvária submetidos ao estímulo com CEMP. Muitos deles são realizados em ossos longos, os quais apresentam um padrão de ossificação principalmente via endocondral, diferentemente da calota craniana, na qual o padrão é principalmente intramembranoso (Huang et al., 2022). Assim, importantes diferenças entre eles – à nível molecular, celular e tecidual (como por exemplo, diferenças na expressão gênica, inflamatória e a presença de tecidos únicos na calvária, como dura máter, pericrânio e suturas) - são relatadas na literatura (Wang et al., 2020), o que podem representar variáveis importantes na resposta ao estímulo do CEMP, portanto devem ser melhor avaliadas em estudos futuros.

Em nosso estudo, a análise histomorfométrica intragrupo revelou que, para o protocolo de aplicação do CEMP de 1 hora, não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos e para todas as variáveis estudadas. Com isto podemos deduzir que, dentro das limitações deste estudo, o protocolo de tempo de exposição deste grupo não demonstrou ter um efeito positivo na cicatrização óssea, diferentemente do GC, pois se analisarmos isoladamente este grupo, para o parâmetro ANO foi possível observar uma maior neoformação óssea, estatisticamente significativa, no período de 60 dias comparada ao período de 14 dias. Assim, a não utilização do CEMP pareceu ser mais benéfica do que a utilização do CEMP no protocolo de aplicação de 1 hora.

Com relação a análise histomorfométrica intragrupo do protocolo de aplicação de 3 horas, os resultados demonstraram uma maior formação óssea (ANO), estatisticamente significativa, entre os períodos de 14 com 45 dias – o

que contrasta novamente, com o resultado obtido pelo protocolo de aplicação de 1 hora, em que não foi possível demonstrar essa diferença estatisticamente significativa entre os períodos - Isto corrobora com o resultado da TCFC relacionadas ao volume, onde foi possível observar que para o GT3h, o defeito apresentou maiores valores nos períodos iniciais (14d e 21d) quando comparados aos períodos mais avançados da cicatrização óssea (45d e 60d). Dessa forma, pode-se inferir que esse menor volume do defeito nesse período poderia ser reflexo de uma maior taxa de formação óssea nessa região.

A TCFC foi utilizada em nosso estudo, com intuito de fornecer dados adicionais quantitativos (pela avaliação dos volumes dos defeitos) e qualitativos (pela técnica da AT). Foi escolhida esta modalidade de exame por imagem por ser um método complementar volumétrico de alta resolução para tecidos mineralizados, amplo acesso ao cirurgião-dentista, bem como de menor dose de radiação em relação a outros métodos como a tomografia *fan beam* (Jacobs et al., 2018; Kim, 2014;)

Foi inicialmente avaliado o volume do defeito ósseo, levando-se em consideração os 03 diferentes grupos – Controle, GT1h e GT3h – bem como em cada grupo o tempo (em dias) decorrido desde a execução dos defeitos – 14d, 21d, 45d e 60d. Pelos nossos resultados, observou-se que em relação ao volume dos defeitos, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados, mas que, no grupo GT3h, os volumes dos defeitos diferiram entre si em relação aos diferentes tempos estudados, indicando que, para tal grupo, quanto maior era o tempo, menor era o volume (Figura 19). Este resultado indica que houve uma redução maior do volume total do defeito, ou seja, mais formação de tecido de reparo, no caso em que se aplicou o campo eletromagnético por um tempo maior (3h) e que, para este grupo, quanto maior foi o tempo decorrido após esta aplicação – acima de 45 dias – maior foi o

fechamento do defeito. Podemos inferir que, naqueles casos em que se optar pela aplicação de um campo eletromagnético como fator adjuvante para cicatrização óssea, com protocolo de aplicação de 3h, o tempo é um fator a ser considerado, devendo-se então aguardar um maior tempo.

Nos casos da não aplicação do campo (Grupo Controle) e aplicação de um campo por tempo menor (1h) o fator tempo parece não ter uma influência significativa na redução do volume do defeito, o que a princípio parece antagonico, uma vez que quanto mais tempo decorrido, maior a chance de reparo do defeito. Porém, ao analisarmos a Figura 19, observamos que no grupo controle, nos 04 diferentes tempos considerados – 14d, 21d, 45d e 60d – o comportamento dos valores do volume oscila em uma faixa entre 17 a 27 e no grupo GT1h entre 15 a 25 - com períodos alternados de maior e menor volume, o que pode refletir em um processo dinâmico de osteogênese e reabsorção óssea, resultando no final (60d), nos menores valores da faixa de oscilação, ou seja, um maior tempo de fato reduz o volume do defeito.

Este achado indica que há uma redução mais drástica do volume dos defeitos ósseos, após 45 dias, quando há a aplicação de campo eletromagnético por 3h e que os volumes resultantes nesses casos, são numericamente menores que aqueles com o mesmo tempo de reparo relativos à não aplicação ou à aplicação do campo por menos tempo (1h).

Para que fosse possível uma análise qualitativa do tecido de reparo, nas imagens de TCFC, realizou-se a técnica de AT. A aplicação desta técnica utiliza parâmetros matemáticos que possibilitam a distinção de diferenças sutis entre os tecidos, as quais não podem ser detectadas por métodos de inspeções visuais das imagens. A habilidade da AT em reconhecer a heterogeneidade de um tecido já foi comprovada em estudos prévios (Caruso et al., 2018; Miles et al., 2013)

assim como a sua sensibilidade como um biomarcador quantitativos (Gonçalves et al., 2020; Zaccagna et al., 2021).

Os parâmetros de AT caracterizam as diferenças obtidas na escala de cinza entre os pixels de uma região de interesse pré-determinada (ROI) da imagem, as quais são reflexos das propriedades físicas destes tecidos naquela região. Estudos prévios já demonstraram a capacidade da AT como um biomarcados ósseo (Bianchi et al., 2019; Nussi et al., 2022). Neste estudo, consideramos a utilização da técnica de AT como método adicional de análise das imagens de TCFC, uma vez que esta modalidade de exame por imagens é frequentemente utilizada na prática odontológica como meio de avaliação e estadiamento de reparos em tecidos mineralizados, mas que possui a limitação de que pequenos defeitos podem não ser devidamente observados ou corretamente avaliados, apenas por inspeções visuais das imagens, uma vez que o olho humano limita-se à distinção de no máximo, 60 tons de cinza, em condições usuais de avaliação, podendo este número ser ainda menor – abaixo de 30 tons - dependendo de outros fatores, como luminosidade externa, resolução das imagens e grau de experiência do profissional (Wenzel, Moystad, 2010). Desta forma, acreditamos que a técnica de AT das imagens de TCFC fornece resultados estatísticos e objetivos do comportamento do tecido avaliado, possibilitando comparações fidedignas entre grupos.

Analisando nossos resultados em relação aos parâmetros de textura, primeiramente nota-se que o parâmetro “*Contrast*” apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, apresentou maiores valores, em cada um dos 03 grupos estudados - Controle, GT1h e GT3h – naqueles casos em que o tempo decorrido após o preparo do defeito ósseo era maior – em todos os 03 grupos, o tempo 60d apresentou maiores contrastes – Figura 20 - diferindo estatisticamente entre os demais tempos, em cada grupo.

O significado de altos valores de *Contrast* na AT de imagens de TCFC, segundo Nussi et al. (2022), indica a presença nas imagens de um alto ruído e irregularidades, o que pode traduzir uma configuração não homogênea ao osso neoformado. Este achado parece interessante, uma vez que mesmo que haja um maior tempo de reparo, e conseqüentemente mais formação óssea, a AT indicou que a qualidade deste poderia não ser considerada como um padrão favorável, uma vez que as trabéculas ósseas poderiam estar dispostas, por exemplo, em configurações espaciais irregulares, como indicou este parâmetro. De fato, um estudo prévio (Costa et al., 2021), que analisou por meio da AT a qualidade óssea alveolar de sítios de instalação de implantes dentários correlacionando com a estabilidade destes, indicou que foram encontrados altos valores deste parâmetro (*Contrast*) no osso de implantes que apresentaram menores valores de torque em suas instalações. Isso corrobora com achado de que o *Contrast* poderia indicar que a qualidade do tecido ósseo neoformada era irregular e poderia refletir em características menos favoráveis.

Em nosso estudo, para os 03 grupos (Figura 20) o tempo que apresentou menores valores de *Contrast* correspondeu ao tempo 14d, notando-se ainda que nos grupos onde o campo eletromagnético era aplicado – GT1h e GT3h – além do tempo 60d, o tempo 45d apresentou também valores altos de *Contrast*, diferentemente do Grupo Controle. Isso sinaliza para um possível efeito negativo do decorrer do tempo naqueles casos em que o campo eletromagnético era aplicado, ou seja, quando o campo for aplicado, a desorganização do tipo de tecido neoformado aumenta com o tempo do reparo. Este achado é interessante uma vez que poderia se imaginar que ocorresse justamente o contrário, mas os resultados suscitam na hipótese de que o campo eletromagnético possa alterar o padrão do osso formado no reparo.

O segundo parâmetro de textura, dentre aqueles analisados neste estudo, que apresentou resultados que indicaram diferenças estatisticamente significantes, em nossos resultados, foi o parâmetro “*Entropy*” (Figura 22). A “*Entropy*” em AT é um parâmetro de bastante expressividade, uma vez que revela a desordem de distribuição dos níveis de cinza dos pixels na região da imagem analisada (ROI). Quanto mais alto for o valor da *Entropy*, mais aleatoriedade dos valores de pixel haverá naquela região. Como os valores numéricos dos pixels, traduzidos como níveis de cinza da imagem, refletem o grau de atenuação do feixe de raios X daquele tecido, pode-se inferir que essa maior aleatoriedade (alta *Entropy*) reflete que aquele tecido em questão apresenta diferentes graus de mineralização.

Observou-se na análise intergrupo, diferenças estatísticas significativas no tempo de 21d entre o grupo Controle e grupo GT1h, sendo que este último apresentou maiores valores que o Grupo Controle e dentro deste foram também identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos, sendo que o tempo 60d apresentou maiores valores (Figura 22). Desta forma, constata-se que quando analisado o tecido de reparo, em relação à *Entropy*, no tempo 21d, o campo eletromagnético aplicado no protocolo do grupo GT1h pareceu alterar o padrão do grau de mineralização deste tecido, deixando-o menos uniforme, em relação ao grupo no qual não houve a aplicação do campo (Grupo Controle). Além disso, considerando-se apenas este grupo - sem aplicação do campo eletromagnético - observa-se novamente que um maior tempo (60d) suscita em um tecido menos uniforme – maior *Entropy* – o que corrobora com aqueles achados relativos ao parâmetro *Contrast* previamente discutidos.

Gonçalves *et al.* (2020) realizaram um estudo para a avaliação a utilização da técnica de AT para delimitação de tecidos saudáveis e acometidos por lesões de furca em molares nas imagens de TCFC, concluindo que os tecido

que pareciam visualmente saudáveis nas imagens em regiões limítrofes das lesões de furca, apresentavam-se com valores de *Entropy* mais altos que os tecidos ósseos alveolares saudáveis, indicando que este parâmetro atuava como um marcador ósseo nas imagens para delimitação dessas lesões e que estas regiões circunjacentes às lesões apresentavam alterações de graus de mineralização. Estes achados complementam aqueles aqui observados, indicando que o campo eletromagnético, aplicado com o protocolo de GT1h poderia após 21 dias alterar o grau de mineralização do tecido neoformado, deixando-o menos uniforme e que maior número de dias (60d) para caso em que não houve aplicação do campo – Grupo Controle – refletiria também na alteração desta mineralização – traduzida pelo aumento da sua *Entropy*.

Um desafio futuro, em relação a estes achados, em imagens de TCFC pela AT, seria determinar um tempo correto de aplicação do campo eletromagnético para se obter, não apenas uma resolução dos defeitos, mas também, um grau de uniformidade quanto à sua arquitetura (medida pelo *Contrast*) e em sua mineralização (medida pela *Entropy*), correlacionando esses 02 parâmetros a testes laboratoriais específicos de mensuração da qualidade óssea deste tecido, com a finalidade de se comprovar até que ponto esses parâmetros influenciariam de fato no resultado final qualitativo do reparo ósseo. Nesse contexto, estudos futuros podem ser desenvolvidos, com maior número de amostra, grupos e tempos, porém, nossos resultados são importantes, à medida que demonstram que a técnica de AT pode ser um adjuvante na avaliação reparos dos defeitos ósseos, submetidos a campos eletromagnéticos, principalmente quando se considera a realidade atual do uso da TCFC na prática odontológica como um exame complementar frequentemente solicitado em análises ósseas no complexo maxilofacial.

## 6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações do nosso estudo, conclui-se que os dois protocolos utilizados não se mostraram eficazes na aceleração do reparo ósseo em DOC na calota de ratos, devendo ser considerados em estudos futuros as características dos parâmetros (intensidade, frequência, amplitude, duração e tempo de exposição) como variáveis importantes na potencialização dos efeitos do CEMP e dessa forma buscar pelo protocolo ideal que maximize a sua eficácia. Além disso, como praticamente não há estudos de CEMP *in vivo* na região da calota craniana, esta deve ser melhor investigada quanto ao seu papel no estímulo ao CEMP e os mecanismos moleculares, celulares e teciduais envolvidos nesse processo.

## REFERÊNCIAS\*

- 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.
- 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. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24764277.
- Aroni MA, Costa Neto PF, Oliveira GJ, Marcantonio RA, Marcantonio Junior E. Bone repair induced by different bone graft substitutes in critical-sized defects in rat calvaria. *Rev Odontol UNESP.* 2019;48: e20190041. doi: 10.1590/1807-2577.04119.
- Assiotis A, Sachinis NP, Chalidis BE. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. *J Orthop Surg Res.* 2012 Jun 8;7:24. doi: 10.1186/1749-799X-7-24. PMID: 22681718; PMCID: PMC3441225.
- Azan A, Gailliègue F, Mir LM, Breton M. Cell Membrane Electropulsation: Chemical Analysis of Cell Membrane Modifications and Associated Transport Mechanisms. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2017;227:59-71. doi: 10.1007/978-3-319-56895-9\_4. PMID: 28980040.
- Bianchi J, Gonçalves JR, Ruellas ACO, Vimort JB, Yatabe M, Paniagua B, Hernandez P, Benavides E, Soki FN, Cevidanes LHS. Software comparison to analyze bone radiomics from high resolution CBCT scans of mandibular condyles. *Dentomaxillofac Radiol.* 2019 Sep;48(6):20190049. doi: 10.1259/dmfr.20190049. Epub 2019 May 20. PMID: 31075043; PMCID: PMC6747438.
- Biggane P, Jackson X, Nazarian A. Bone composition and healing: Open electromagnetic and biomechanical problems 2016 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). 2016;38:6026-9. doi: 10.1109/EMBC.2016.7592102.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*. 1998 Jul;9(4):310-6. doi: 10.1097/00001665-199807000-00004. PMID: 9780924.

Caruso D, Zerunian M, Ciolina M, de Santis D, Rengo M, Soomro MH, et al. Haralick's texture features for the prediction of response to therapy in colorectal cancer: a preliminary study. *Radiol Med*. 2018 Mar;123(3):161-167. doi: 10.1007/s11547-017-0833-8. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29119525.

Cebrián JL, Gallego P, Francés A, Sánchez P, Manrique E, Marco F, et al. Comparative study of the use of electromagnetic fields in patients with pseudoarthrosis of tibia treated by intramedullary nailing. *Int Orthop*. 2010 Mar;34(3):437-40. doi: 10.1007/s00264-009-0806-1. Epub 2009 May 22. PMID: 19462169; PMCID: PMC2899307.

Costa ALF, de Souza Carreira B, Fardim KAC, Nussi AD, da Silva Lima VC, Miguel MMV, et al. Texture analysis of cone beam computed tomography images reveals dental implant stability. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2021 Dec;50(12):1609-1616. doi: 10.1016/j.ijom.2021.04.009. Epub 2021 May 4. PMID: 33962826.

Di Bartolomeo M, Cavani F, Pellacani A, Grande A, Salvatori R, Chiarini L, et al. Pulsed Electro-Magnetic Field (PEMF) Effect on Bone Healing in Animal Models: A Review of Its Efficacy Related to Different Type of Damage. *Biology (Basel)*. 2022 Mar 5;11(3):402. doi: 10.3390/biology11030402. PMID: 35336776;

Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan*. 1957;12(10):1158-1162. doi: 10.1143/JPSJ.12.1158.

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

Gonçalves BC, de Araújo EC, Nussi AD, Bechara N, Sarmento D, Oliveira MS, Santamaria MP, Costa ALF, Lopes S. Texture analysis of cone-beam computed tomography images assists the detection of furcal lesion. *J Periodontol*. 2020 Sep;91(9):1159-1166. doi: 10.1002/JPER.19-0477. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32003465.

Guo L, Kubat NJ, Nelson TR, Isenberg RA. Meta-analysis of clinical efficacy of pulsed radio frequency energy treatment. *Ann Surg*. 2012;255(3):457-67.

Hannemann PF, Mommers EH, Schots JP, Brink PR, Poeze M. The effects of low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic fields bone growth stimulation in acute fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2014 Aug;134(8):1093-106. doi: 10.1007/s00402-014-2014-8. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24895156.

Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural features for image classification. *IEEE Transactions Systems Man Cybernetics*. 1973;SMC-3(6):610-62. doi: 10.1109/TSMC.1973.4309314.

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. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28965919.

Hinrikus H, Karpowicz J, Naarala J. Electromagnetic fields in biology and medicine. *Int J Radiation Biol*. 2018;94(10):873-6. doi: 10.1080/09553002.2018.1533359.

Huang EE, Zhang N, Shen H, Li X, Maruyama M, Utsunomiya T, et al. Novel Techniques and Future Perspective for Investigating Critical-Size Bone Defects. *Bioengineering (Basel)*. 2022 Apr 11;9(4):171. doi: 10.3390/bioengineering9040171. PMID: 35447731; PMCID: PMC9027954.

Hu H, Yang W, Zeng Q, Chen W, Zhu Y, Liu W, et al. Promising application of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) in musculoskeletal disorders. *Biomed Pharmacother*. 2020 Nov;131:110767. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110767. Epub 2020 Sep 23. PMID: 33152929.

Jacobs R, Salmon B, Codari M, Hassan B, Bornstein MM. Cone beam computed tomography in implant dentistry: recommendations for clinical use. *BMC Oral Health*. 2018 May 15;18(1):88. doi: 10.1186/s12903-018-0523-5. PMID: 29764458; PMCID: PMC5952365.

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/ $\beta$ -catenin signaling-associated mechanism. *Sci Rep*. 2016 Aug 24;6:32045. doi: 10.1038/srep32045. PMID: 27555216; PMCID: PMC4995433.

Kim DG. Can dental cone beam computed tomography assess bone mineral density? *J Bone Metab.* 2014 May;21(2):117-26. doi: 10.11005/jbm.2014.21.2.117. Epub 2014 May 31. PMID: 25006568; PMCID: PMC4075265.

Lee EW, Maffulli N, Li CK, Chan KM. Pulsed magnetic and electromagnetic fields in experimental achilles tendonitis in the rat: A prospective randomized study. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997;78(4):399-404

Lin CC, Chang YT, Lin RW, Chang CW, Wang GJ, Lai KA. Single pulsed electromagnetic field restores bone mass and microarchitecture in denervation/disuse osteopenic mice. *Med Eng Phys.* 2020 Jun;80:52-59. doi: 10.1016/j.medengphy.2019.10.004. Epub 2020 May 4. PMID: 32376078.

Liu Y, Hao L, Jiang L, Li H. Therapeutic effect of pulsed electromagnetic field on bone wound healing in rats. *Electromagn Biol Med.* 2021 Jan 2;40(1):26-32. doi: 10.1080/15368378.2020.1851252. Epub 2020 Nov 29. PMID: 33251878

Lullini G, Cammisa E, Setti S, Sassoli I, Zaffagnini S, Marcheggiani Muccioli GM. Role of pulsed electromagnetic fields after joint replacements. *World J Orthop.* 2020 Jun 18;11(6):285-293. doi: 10.5312/wjo.v11.i6.285. PMID: 32572365; PMCID: PMC7298453.

Mansourian M, Shanei A. Evaluation of Pulsed Electromagnetic Field Effects: A Systematic Review and Meta-Analysis on Highlights of Two Decades of Research In Vitro Studies. *Biomed Res Int.* 2021 Jul 29;2021:6647497. doi: 10.1155/2021/6647497. PMID: 34368353; PMCID: PMC8342182.

Massari L, Benazzo F, Falez F, Perugia D, Pietrogrande L, Setti S, et al. 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.

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. PMID: 1634583.

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. doi: 10.1016/j.orthres.2005.03.015. PMID: 15936919.

Miles KA, Ganeshan B, Hayball MP. CT texture analysis using the filtration-histogram method: what do the measurements mean? *Cancer Imaging*. 2013 Sep 23;13(3):400-6. doi: 10.1102/1470-7330.2013.9045. PMID: 24061266; PMCID: PMC3781643.

Moretti L, Bizzoca D, Giancaspro GA, Cassano GD, Moretti F, Setti S, et al. Biophysical Stimulation in Athletes' Joint Degeneration: A Narrative Review. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Nov 4;57(11):1206. doi: 10.3390/medicina57111206. PMID: 34833424; PMCID: PMC8619315.

Murphy MP, Quarto N, Longaker MT, Wan DC. Calvarial Defects: Cell-Based Reconstructive Strategies in the Murine Model. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017 Dec;23(12):971-981. doi: 10.1089/ten.TEC.2017.0230. Epub 2017 Oct 4. PMID: 28825366; PMCID: PMC5734144.

Nunes CMM, Ferreira CL, Bernardo DV, Lopes CCR, Collino L, da Silva Lima VC, et al. Evaluation of pulsed electromagnetic field protocols in implant osseointegration: in vivo and in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2020 Oct 9. doi: 10.1007/s00784-020-03612-x. Epub ahead of print. PMID: 33033921.

Nunes CMM, Ferreira CL, Bernardo DV, Oblack GB, Longo M, Santamaria MP, et al. The influence of LLLT applied on applied on calvarial defect in rats under effect of cigarette smoke. *J Appl Oral Sci*. 2019;27:1–10. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0621.

Nursal TZ, Bal N, Anarat R, Colakoglu T, Noyan T, Moray G, et al. Effects of a static magnetic field on wound healing: results in experimental rat colon anastomoses. *Am J Surg*. 2006 Jul;192(1):76-81. PubMed PMID: 16769280.

Nussi AD, de Castro Lopes SLP, De Rosa CS, Gomes JPP, Ogawa CM, Braz-Silva PH, et al. In vivo study of cone beam computed tomography texture analysis of mandibular condyle and its correlation with gender and age. *Oral Radiol*. 2022 May 18. doi: 10.1007/s11282-022-00620-3. Epub ahead of print. PMID: 35585223.

Oltean-Dan D, Dogaru GB, Apostu D, Mester A, Benea HRC, Paiusan MG, et al. Enhancement of bone consolidation using high-frequency pulsed electromagnetic fields (HF-PEMFs): An experimental study on rats. *Bosn J Basic Med Sci*. 2019 May 20;19(2):1-209. doi: 10.17305/bjbms.2019.3854. PMID: 30794499; PMCID: PMC6535386.

Peng L, Fu C, Xiong F, Zhang Q, Liang Z, Chen L, et al. Effectiveness of Pulsed Electromagnetic Fields on Bone Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Bioelectromagnetics*. 2020 Jul;41(5):323-37. doi: 10.1002/bem.22271. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32495506

Qiu XS, Li XG, Chen YX. Pulsed electromagnetic field (PEMF): A potential adjuvant treatment for infected nonunion. *Med Hypotheses*. 2020 Mar;136:109506. doi: 10.1016/j.mehy.2019.109506. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31841766.

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. PMID: 26042793; PMCID: PMC4516580.

Rubik B. Bioelectromagnetics & the future of medicine. *Adm Radiol J*. 1997 Aug;16(8):38-46. PMID: 10170276.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986 Apr;(205):299-308. PMID: 3084153.

Tong J, Chen Z, Sun G, Zhou J, Zeng Y, Zhong P, et al. The Efficacy of Pulsed Electromagnetic Fields on Pain, Stiffness, and Physical Function in Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pain Res Manag*. 2022 May 9;2022:9939891. doi: 10.1155/2022/9939891. PMID: 35586276; PMCID: PMC9110240.

Varani K, Vincenzi F, Pasquini S, Blo I, Salati S, Cadossi M, De Mattei M. Pulsed Electromagnetic Field Stimulation in Osteogenesis and Chondrogenesis: Signaling Pathways and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 15;22(2):809. doi: 10.3390/ijms22020809. PMID: 33467447; PMCID: PMC7830993.

Wang D, Gilbert JR, Zhang X, Zhao B, Ker DFE, Cooper GM. Calvarial Versus Long Bone: Implications for Tailoring Skeletal Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020 Feb;26(1):46-63. doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0353. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31588853.

Wang L, Xie S, Zhu S, Gao C, He C. Efficacy of Pulsed Electromagnetic Fields on Experimental Osteopenia in Rodents: A Systematic Review.

Bioelectromagnetics. 2021 Jul;42(5):415-431. doi: 10.1002/bem.22348. Epub 2021 May 18. PMID: 34004034.

Wang J, An Y, Li F, Li D, Jing D, Guo T, Luo E, Ma C. 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.

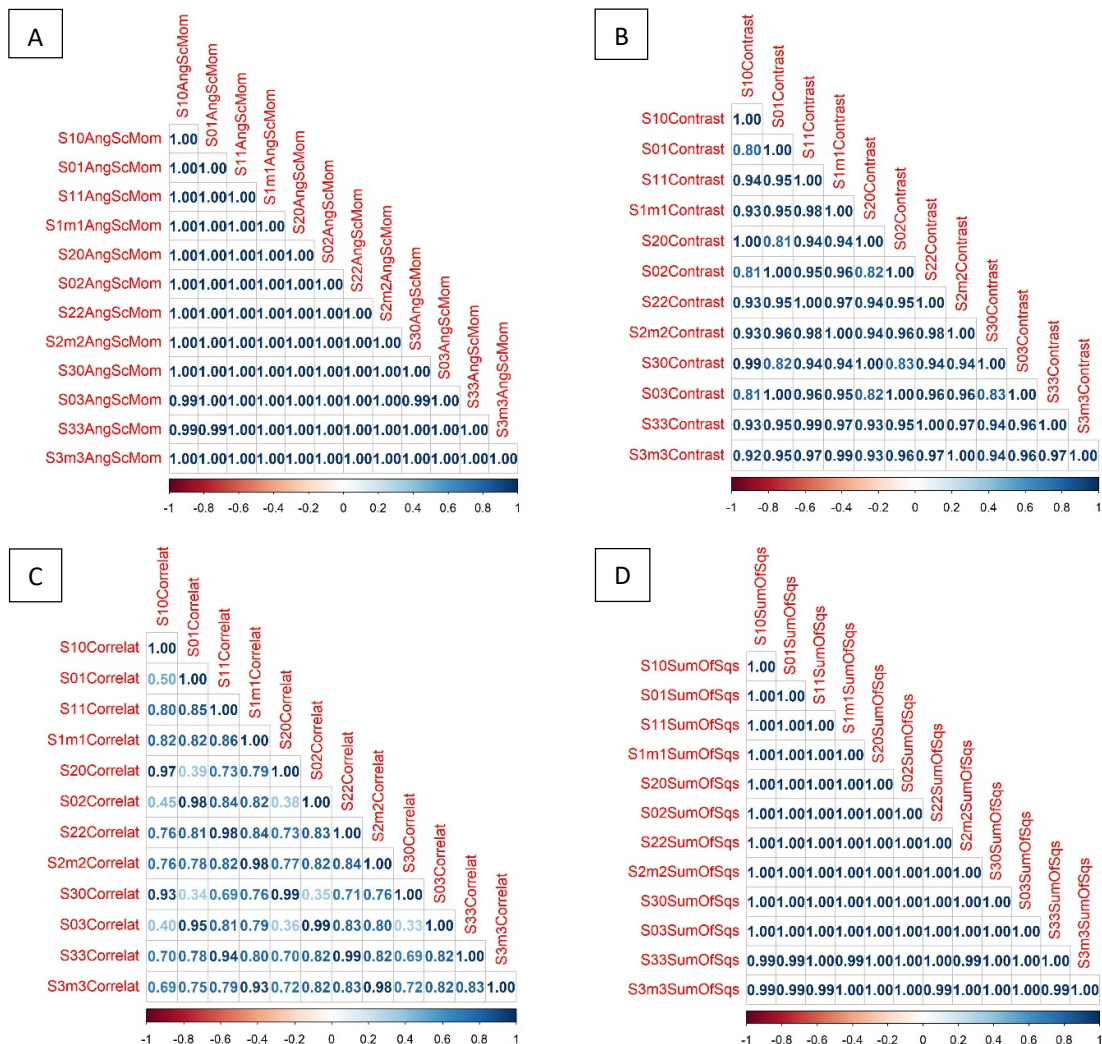
Wenzel A, Møystad A. Work flow with digital intraoral radiography: a systematic review. *Acta Odontol Scand*. 2010 Mar;68(2):106-14. doi: 10.3109/00016350903514426. PMID: 20141365.

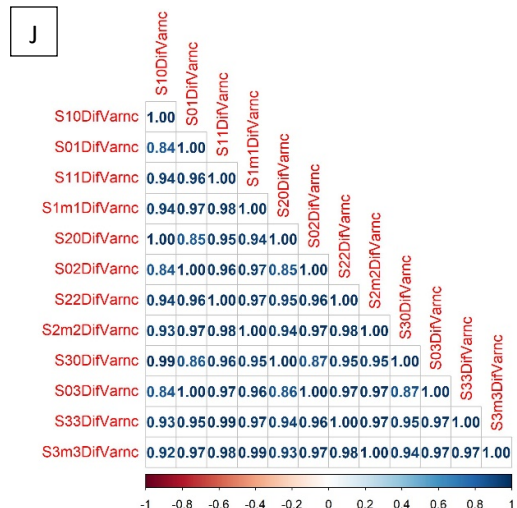
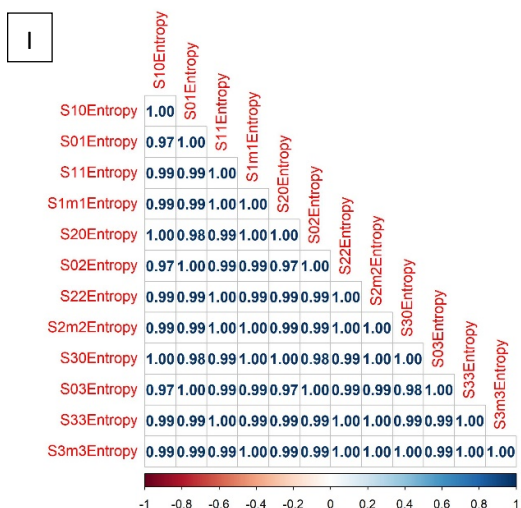
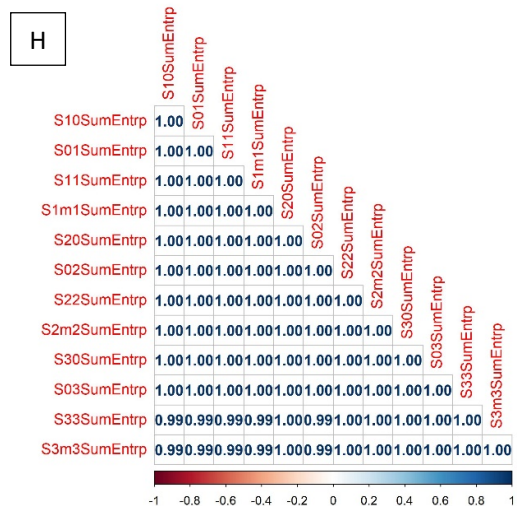
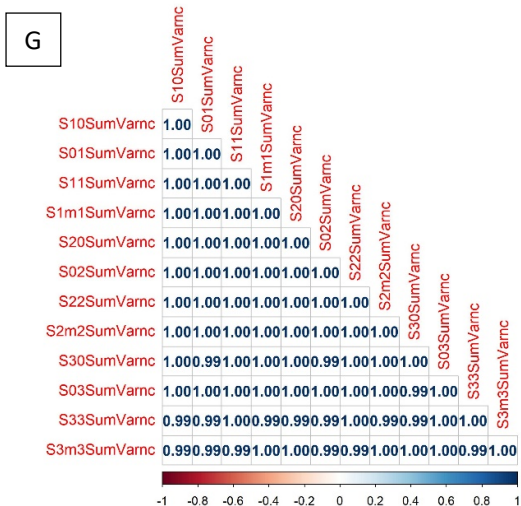
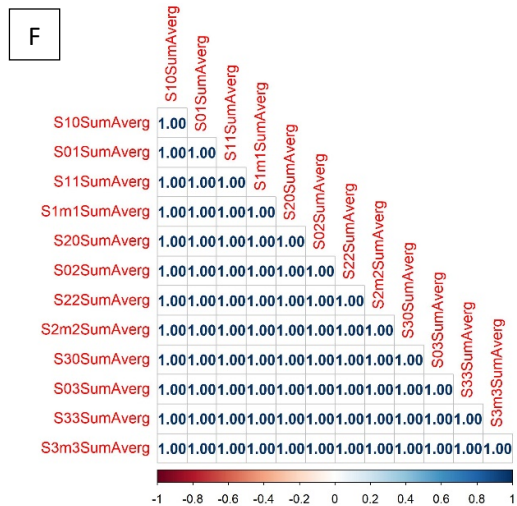
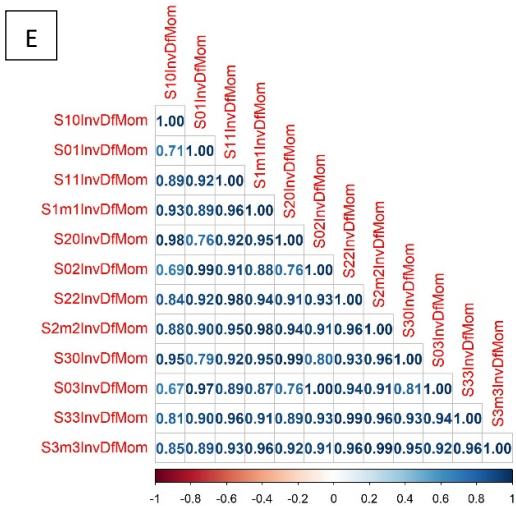
Yuan J, Xin F, Jiang W. Underlying Signaling Pathways and Therapeutic Applications of Pulsed Electromagnetic Fields in Bone Repair. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1581–94. doi: 10.1159/000489206.

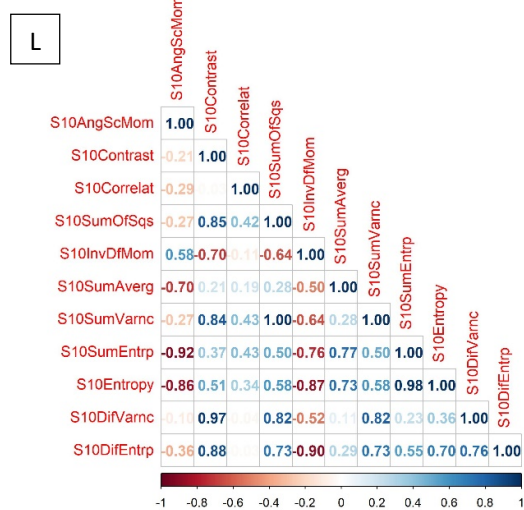
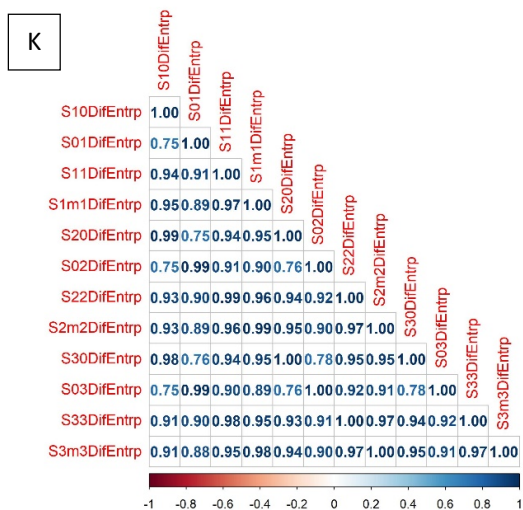
Li Y, Pan Q, Zhang N, Wang B, Yang Z, Ryaby JT. A novel pulsed electromagnetic field promotes distraction osteogenesis via enhancing osteogenesis and angiogenesis in a rat model. *J Orthop Translation*. 2020;25:87-95. doi: 10.1016/j.jot.2020.10.007

Zaccagna F, Ganeshan B, Arca M, Rengo M, Napoli A, Rundo L, et al. CT texture-based radiomics analysis of carotid arteries identifies vulnerable patients: a preliminary outcome study. *Neuroradiology*. 2021 Jul;63(7):1043-1052. doi: 10.1007/s00234-020-02628-0. Epub 2021 Jan 3. PMID: 33392734.

## APÊNDICE A — Coeficientes de correlação de Spearman entre as diferentes direções dos 11 parâmetros iniciais selecionados para a AT







Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE B** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo, para os volumes dos defeitos

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	25.5	3.4	21.7	25.9	28.6
	21d	21.1	6.5	15.0	19.9	29.7
	45d	21.9	6.9	11.7	24.4	27.1
	60d	18.8	7.7	10.1	18.4	28.2
GT1h	14d	16.5	3.8	12.1	16.7	20.7
	21d	25.4	5.4	19.3	24.9	32.4
	45d	23.0	7.3	17.6	20.2	33.7
	60d	16.5	7.1	10.7	14.5	26.2
GT3h	14d	20.5	7.5	12.4	19.9	30.0
	21d	24.1	6.5	18.2	22.7	32.7
	45d	7.9	2.9	4.7	7.9	11.0
	60d	12.7	2.9	10.3	11.8	17.0

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE C** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Contrast S(1,0)*

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.99	0.23	0.76	0.98	1.26
	21d	0.72	0.26	0.46	0.66	1.08
	45d	1.38	0.71	0.94	1.08	2.43
	60d	2.33	0.55	1.66	2.41	2.85
GT1h	14d	0.66	0.19	0.46	0.63	0.91
	21d	1.14	0.13	0.96	1.17	1.26
	45d	1.97	0.66	1.12	2.11	2.53
	60d	1.79	0.77	0.99	1.70	2.78
GT3h	14d	0.82	0.24	0.58	0.80	1.09
	21d	1.05	0.38	0.51	1.14	1.40
	45d	1.53	0.53	1.10	1.37	2.27
	60d	2.86	0.61	2.32	2.81	3.50

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE D** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura *SumAverg* S(1,0)

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	14.7	5.5	8.9	14.9	20.3
	21d	8.2	2.9	5.6	7.5	12.3
	45d	10.1	2.9	7.4	9.5	14.1
	60d	17.4	6.7	9.8	17.3	25.2
GT1h	14d	13.9	4.3	8.8	13.8	19.3
	21d	17.7	3.4	14.4	17.6	21.3
	45d	14.0	2.6	11.1	13.8	17.2
	60d	10.2	3.6	5.3	10.9	13.9
GT3h	14d	12.7	3.9	8.7	12.4	17.3
	21d	12.8	3.1	10.1	12.3	16.4
	45d	17.6	7.2	8.9	17.6	26.1
	60d	12.5	3.4	8.4	12.9	15.9

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE E** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura Entropy S(1,0)

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	1.58	0.12	1.40	1.62	1.68
	21d	1.23	0.19	0.95	1.29	1.39
	45d	1.40	0.28	0.98	1.52	1.59
	60d	1.71	0.22	1.42	1.77	1.89
GT1h	14d	1.41	0.11	1.30	1.39	1.57
	21d	1.68	0.06	1.62	1.69	1.73
	45d	1.73	0.12	1.59	1.75	1.83
	60d	1.47	0.32	0.99	1.60	1.68
GT3h	14d	1.47	0.13	1.30	1.48	1.62
	21d	1.57	0.16	1.33	1.61	1.70
	45d	1.80	0.25	1.49	1.84	2.06
	60d	1.64	0.29	1.24	1.70	1.91

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE F** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(1,0)*

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.965	0.008	0.954	0.967	0.974
	21d	0.966	0.010	0.951	0.969	0.973
	45d	0.954	0.013	0.941	0.953	0.969
	60d	0.959	0.008	0.949	0.960	0.968
GT1h	14d	0.969	0.011	0.958	0.969	0.980
	21d	0.968	0.011	0.959	0.966	0.982
	45d	0.962	0.015	0.946	0.960	0.981
	60d	0.961	0.011	0.950	0.959	0.975
GT3h	14d	0.967	0.008	0.962	0.964	0.978
	21d	0.966	0.005	0.962	0.965	0.972
	45d	0.977	0.007	0.968	0.978	0.985
	60d	0.970	0.003	0.967	0.970	0.973

**APÊNDICE G** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(0,1)*

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.957	0.012	0.940	0.961	0.968
	21d	0.972	0.011	0.957	0.974	0.984
	45d	0.964	0.008	0.952	0.966	0.970
	60d	0.967	0.020	0.947	0.966	0.987
GT1h	14d	0.968	0.015	0.953	0.967	0.984
	21d	0.971	0.013	0.958	0.970	0.987
	45d	0.975	0.006	0.971	0.973	0.983
	60d	0.959	0.008	0.947	0.960	0.967
GT3h	14d	0.971	0.009	0.960	0.972	0.980
	21d	0.968	0.014	0.947	0.974	0.978
	45d	0.980	0.010	0.966	0.981	0.990
	60d	0.969	0.007	0.960	0.970	0.975

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE H** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(1,1)*

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.930	0.015	0.912	0.932	0.946
	21d	0.947	0.012	0.931	0.950	0.959
	45d	0.929	0.012	0.914	0.931	0.940
	60d	0.934	0.026	0.909	0.932	0.962
GT1h	14d	0.944	0.023	0.924	0.943	0.967
	21d	0.948	0.018	0.934	0.942	0.975
	45d	0.944	0.021	0.919	0.943	0.970
	60d	0.932	0.010	0.922	0.932	0.942
GT3h	14d	0.948	0.012	0.935	0.946	0.964
	21d	0.945	0.012	0.929	0.948	0.956
	45d	0.960	0.017	0.942	0.961	0.977
	60d	0.943	0.006	0.936	0.943	0.950

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE I** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(1,-1)*

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.928	0.009	0.916	0.931	0.936
	21d	0.940	0.011	0.926	0.941	0.952
	45d	0.921	0.022	0.899	0.922	0.940
	60d	0.927	0.026	0.900	0.927	0.954
GT1h	14d	0.946	0.017	0.924	0.949	0.960
	21d	0.942	0.027	0.918	0.940	0.971
	45d	0.938	0.019	0.926	0.930	0.966
	60d	0.916	0.024	0.890	0.913	0.946
GT3h	14d	0.945	0.013	0.934	0.942	0.964
	21d	0.938	0.014	0.918	0.944	0.946
	45d	0.959	0.015	0.941	0.959	0.977
	60d	0.940	0.004	0.935	0.940	0.944

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE J** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura *Correlat S(2,0)*

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.889	0.026	0.853	0.896	0.913
	21d	0.892	0.034	0.844	0.903	0.920
	45d	0.850	0.044	0.796	0.855	0.896
	60d	0.862	0.022	0.837	0.861	0.888
GT1h	14d	0.908	0.024	0.887	0.903	0.938
	21d	0.898	0.032	0.872	0.889	0.941
	45d	0.873	0.046	0.826	0.865	0.937
	60d	0.867	0.038	0.830	0.864	0.911
GT3h	14d	0.902	0.025	0.875	0.898	0.934
	21d	0.893	0.015	0.873	0.895	0.908
	45d	0.922	0.027	0.887	0.925	0.951
	60d	0.897	0.011	0.886	0.897	0.906

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE K** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura Correlat S(0,2)

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.863	0.043	0.806	0.869	0.910
	21d	0.915	0.036	0.869	0.919	0.955
	45d	0.884	0.020	0.857	0.888	0.903
	60d	0.891	0.065	0.825	0.889	0.959
GT1h	14d	0.906	0.039	0.860	0.907	0.951
	21d	0.908	0.041	0.867	0.904	0.959
	45d	0.919	0.019	0.907	0.912	0.947
	60d	0.866	0.021	0.839	0.869	0.886
GT3h	14d	0.919	0.023	0.888	0.922	0.943
	21d	0.904	0.038	0.849	0.916	0.934
	45d	0.931	0.037	0.882	0.938	0.967
	60d	0.890	0.023	0.861	0.893	0.914

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE L** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura Correlat S(2,2)

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.776	0.043	0.720	0.782	0.822
	21d	0.838	0.040	0.782	0.846	0.877
	45d	0.774	0.026	0.739	0.780	0.796
	60d	0.782	0.080	0.700	0.776	0.877
GT1h	14d	0.834	0.057	0.771	0.839	0.887
	21d	0.832	0.058	0.782	0.816	0.916
	45d	0.819	0.067	0.742	0.815	0.906
	60d	0.777	0.032	0.740	0.780	0.809
GT3h	14d	0.843	0.035	0.808	0.836	0.891
	21d	0.828	0.028	0.794	0.827	0.862
	45d	0.862	0.059	0.794	0.865	0.922
	60d	0.809	0.019	0.788	0.806	0.834

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE M** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura Correlat S(2,-2)

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.768	0.035	0.725	0.769	0.809
	21d	0.810	0.033	0.767	0.817	0.838
	45d	0.755	0.060	0.687	0.762	0.809
	60d	0.758	0.077	0.684	0.751	0.845
GT1h	14d	0.833	0.045	0.768	0.850	0.865
	21d	0.815	0.078	0.743	0.808	0.899
	45d	0.798	0.058	0.760	0.774	0.884
	60d	0.738	0.067	0.676	0.730	0.816
GT3h	14d	0.837	0.038	0.808	0.827	0.887
	21d	0.803	0.028	0.766	0.807	0.832
	45d	0.861	0.050	0.800	0.861	0.922
	60d	0.794	0.013	0.783	0.790	0.812

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE N** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura Correlat S(3,0)

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.784	0.048	0.716	0.797	0.827
	21d	0.797	0.063	0.708	0.814	0.852
	45d	0.714	0.081	0.609	0.725	0.796
	60d	0.728	0.039	0.691	0.721	0.779
GT1h	14d	0.821	0.038	0.788	0.812	0.874
	21d	0.801	0.056	0.759	0.782	0.879
	45d	0.757	0.080	0.687	0.736	0.871
	60d	0.745	0.068	0.680	0.740	0.821
GT3h	14d	0.814	0.046	0.761	0.810	0.874
	21d	0.791	0.033	0.745	0.800	0.818
	45d	0.841	0.054	0.768	0.849	0.898
	60d	0.794	0.024	0.765	0.798	0.814

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE O** — Medidas de posição e dispersão por grupo e tempo para o parâmetro de textura Correlat S(0,3)

Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	14d	0.739	0.082	0.635	0.745	0.834
	21d	0.841	0.066	0.755	0.848	0.915
	45d	0.779	0.033	0.734	0.785	0.811
	60d	0.790	0.123	0.662	0.787	0.922
GT1h	14d	0.828	0.069	0.742	0.832	0.907
	21d	0.823	0.073	0.747	0.815	0.917
	45d	0.846	0.037	0.820	0.833	0.899
	60d	0.753	0.029	0.719	0.756	0.783
GT3h	14d	0.853	0.039	0.800	0.859	0.893
	21d	0.818	0.066	0.724	0.836	0.874
	45d	0.862	0.075	0.760	0.875	0.936
	60d	0.781	0.042	0.728	0.785	0.825

Fonte: Elaborada pelo autor.

**APÊNDICE P** – Dissertação no formato de artigo para submissão para publicação no *Journal Of Periodontal Research*

**Effect of the Pulsed Electromagnetic Field in the repair of a calvaria critical bone defect in rats**

Nicole Berton de Moura<sup>2</sup>, Victória Clara da Silva Lima<sup>2</sup>, Camila Lopes Ferreira<sup>1</sup>, Camilla Magnoni Moretto<sup>1</sup>, Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes<sup>1</sup>, Andrea Carvalho de Marco<sup>1</sup>, Maria Aparecida Neves Jardim<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Diagnosis and Surger, institute of Science and Technology of Sao Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista (unesp), Sao Jose dos Campos, SP, Brazil,

<sup>2</sup> Graduate student of institute of Science and Technology of Sao Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Sao Jose dos Campos, SP, Brazil.

Corresponding author: Nicole Berton de Moura

Av Engenheiro Francisco Jose longo, 777, São Jose dos Campos, São Paulo,  
Zip code: 12.245-000, Brazil  
Phone: +5512 3947-9000

E-mail: nicole.berton@unesp.br

## ***ABSTRACT***

**Background:** The repair of critical bone defects represents a major clinical challenge, among the adjuvant therapies that have a potential benefit in accelerating bone repair, Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) stands out, which through its biophysical stimulation can modulate physiological parameters of differentiation, proliferation and mineralization of bone cells.

**Objective:** The present study aimed to evaluate the effect of two protocols of therapy with PEMF on bone neoformation on calvaria critical defects in rats.

**Methods:** Ninety-six adult male rats were randomly divided into 3 experimental groups: Control Group (CG): (n=32); GT1h: (n=32) and GT3h: (n=32). The animals were submitted to surgery for the creation of a critical defect in the skull and to therapy with PEMF following the following fixed parameters: 25 cycles of -1 mTesla to + 1 mTesla in 200 microseconds that were repeated at a rate of 15 Hz. The duration of exposure to PEMF in the test groups were 1 hour (GT1h) and 3 hours (GT3h), both for 5 days a week. The animals were euthanized at 14, 21, 45 and 60 days. The specimens were processed for histological, histomorphometric and texture and volume analysis, obtained by CBCT.

**Results:** Histomorphometric and volume analyzes revealed that there was no statistically significant difference in the repair of bone defects between both groups receiving PEMF therapy and CG. The texture analysis revealed that there was a statistically significant difference between the groups, except for the entropy parameter, in which the GT1h group presented a higher value compared to GC, both in the period of 21 days.

**Conclusion:** It was not possible, in this study, to show a potential benefit of using PEMF on bone healing of calvaria critical defects. Therefore, this region should be better explored in future studies, as well as seeking the ideal parameters related to the PEMF generator in order to maximize effects on bone repair.

*Keywords: Bone Regeneration. Electromagnetic Fields. Critical Bone defect.*

## *Introduction*

The regeneration of bone defects caused by different etiological agents such as trauma, infection, previous radiation and excision of a bone tumor<sup>1</sup> remains a major challenge in dentistry. Bone regeneration is a complex process that relates several cellular and molecular events, which physiologically require time for the complete renewal of the affected site. Bone healing can be encouraged by the application of molecules, such as bone morphogenetic proteins (BMPs) or also, through physical stimuli, such as pulsed electromagnetic fields (PEMFs)<sup>2</sup>. These are low-frequency fields that have square or trapezoidal waveforms and specific amplitudes, ranging between 6 and 500 Hz<sup>3,4</sup>. They are characterized by a high rate of variation (Tesla / s) that induces bioelectric currents in tissues, which promote biological effects<sup>4</sup>. These effects generated by electromagnetic fields (EMFs) have been extensively investigated in the literature over the last four decades<sup>5</sup>.

Studies show that PEMF treatment can promote satisfactory therapeutic effects in a wide range of bone diseases,<sup>6,7,8</sup> this is because they stimulate the proliferation and activation of osteoblasts, neo-angiogenic processes as well as several cells signaling pathways, that constitute essential requirements for promoting bone repair<sup>9</sup>. With the discovery of piezoelectricity and bioelectrical potentials in bone, the possibility of modifying the behavior of bone cells by applying electrical energy started to be investigated. The exact mechanisms of PEMFs are still not fully elucidated in the literature and are still under debate, however many reports describe them at the cellular and molecular level<sup>3</sup>. Cells have an electrically charged plasma membrane, whose function is to regulate the concentration of intracellular and extracellular ions. This precision of ion regulation generates a membrane potential, which is also considered an electrical membrane potential<sup>10</sup>. The existence of membrane electrical potential in the cell gives rise to endogenous electromagnetic fields. Therefore, when there is an external stimulation by PEMF, the potentiation of cellular effects occurs, since the cell membrane is the main target of action of PEMFs<sup>9,11</sup> and this biophysical therapy plays an important role in bone stimulation. Preclinical studies have shown that PEMFs activate membrane receptors and transmembrane channels that may have a promoting effect on bone cell function, bone mineralization, bone repair and reduction of the inflammatory process<sup>12</sup>. Physical stimulation initiates signaling cascades, which effectively promote osteogenesis and angiogenesis in an orchestrated spatio-temporal manner and enhance the self-repair capacity of bone tissues<sup>9</sup>.

Regarding preclinical research, the most in vivo craniofacial model used in the literature is the creation of a critical bone defect size (CBDS) in rat's calvaria<sup>1</sup> by

definition, a CBDS is the smallest bone defect size that does not heal completely throughout the natural life of an animal. Regarding the size, from 4 mm it can already be considered a critical bone defect<sup>2</sup>. The repair of this defect is a challenge, since, under these conditions, the bone tissue is not able to regenerate spontaneously. Therefore, it is necessary to investigate techniques that can promote regeneration of the impaired tissue and to restore its functional and mechanical stability and to analyze them properly.

Although positive effects on bone repair associated with PEMFs have been demonstrated, the literature is still under debate concerning PEMF protocols (frequency, amplitude, intensity, duration of exposure) so there is a need for more animal studies to understand the PEMF's mechanisms of action in critical bone defects and its potential for application in humans.

The present study aimed to analyze two different protocols of application of the Pulsed Electromagnetic Field in the repair in a model of defect in the calvaria of rats.

## Material and Methods

This study was conducted in accordance with the Ethical Principles for Animal Experimentation, adopted by the National council for animal experimentation – CONCEA and was approved by the Research Ethics Committee of the Institute of Science and Technology of Sao Jose dos Campos/UNESP (annex A). This paper also followed the guidelines of animal Research: Reporting in vivo experiments – ARRIVE. Ninety-six male rats (*Rattus norvegicus*, albinus variation, Wistar) were provided by the Central Biottery of Unesp (Botucatu Campus, SP). The animal were 90 days old, weighing around 250 to 300 grams, kept in cages at room temperature, fed with food and water ad libitum. They were randomly divided into 3 experimental groups: Control Group (CG; n= 32), where only surgery for critical bone defect of the calvaria was performed and the animals were not exposed to PEMF; Test Group 1h (GT1h; n= 32), where critical bone defect surgery was performed following subsequent exposure to PEMF for a period of 1 hour during 5 days a week; and Test Group 3h (GT3h; n= 32), in which critical bone defect surgery was performed following subsequent exposure to PEMF for a period of 3 hours during 5 days a week. Each group was subdivided into 4 euthanasia periods (14, 21, 45 and 60 days)

## Creation of the CBDS

The animals were anesthetized with ketamine 10% (Dopalen - Agribrands, Paulínea, Brazil) 100mg/Kg and xylazine 2% (Anasedan - Vetbrands, Jacareí, Brazil), 10mg/Kg – a substance with sedative and analgesic properties - administered intramuscularly (IM), using a sterile insulin needle. After anesthesia, the frontal region was shaved using razor blades. Then, antiseptics of these regions was performed with 0.2% chlorhexidine gluconate solution and the critical bone defect was made in the parietal bone.

A linear incision of approximately 2.0 cm was made in the center of the animal's calvaria, exposing the parietal bone. The defect was performed by a trephine drill with an external diameter of 5 mm (Neodent - Brazil) under abundant irrigation with saline solution and an electric motor (Driller BLM 600 Plus) that allows speed control at 960 rpm, and refrigeration with a constant flow of sterile saline. This was performed very carefully to avoid damage to the dura mater or superior sagittal sinus. After the removal, the bone block was discarded. Then, after controlling the bleeding, the amalgam markings were performed - in an L shape - on the skullcap, using the CVDentus® piezoelectric device (CVD), through the w1-0 tip. Markings were made 2 mm away from the edge of the defect and in the center of it to serve as a reference for histomorphometric analysis (in order to delimit the bone limit from the possible subsequent bone formation) and guiding the section of the histological specimen in the region of interest. The procedure was ended by suturing the soft tissue with 4.0 silk thread (Ethicon – Johnson & Johnson) and cleaning the operated region with 0.2% chlorhexidine solution.

.

## Exposure to Pulsed Electromagnetic Field (PEMF)

The PEMF exposure device consists of a pulsatile signal generator and Helmholtz coils. Rats were subjected to PEMF exposure with the following fixed parameters: 25 cycles of -1 mTesla to +1 mTesla in 200 microseconds that were repeated at a rate of 15 Hz. The duration of exposure to CEMP was 1 hour and 3 hours

a day for 5 days a week in the respective groups: GT1h and GT3h13,14 until the euthanasia of the animals.

### *Tissue processing*

The animals were euthanized according to each experimental period with high-dose anesthetic solution and then the animals were decapitated to remove the cap. The specimens were cataloged and fixed in 10% formalin for a maximum period of 48 hours. After this period, they were kept in 70% alcohol for cone beam computed tomography analyses (CBCT). After the CBCT, the decalcification process was started in formic acid (Merck KGaA, in Darmstadt, Germany) at a concentration of 20% for 20 days. After decalcification the specimens were embedded in paraffin. Each fragment was included, in the direction of the cut surface, in a paraffin block and the sections were obtained serially with 5  $\mu\text{m}$  thickness, adding up to a total of ten slides with 10 sections per block that were submitted to routine histological processing. The staining used was Hematoxylin and Eosin (HE – Merck & Co, Inc.) and the histological and histomorphometric analysis performed under light microscopy.

### *CBCT images*

For acquisitions, the caps were stabilized on a styrofoam support. The images were obtained using an I-Cat Next Generation device (Imaging Sciences International, Hatfield, PA, USA), with the following parameters: field of view (FOV) of 8.0x8.0cm, spatial resolution (voxel size) of 0.2mm, 120kVp, 37.07mA in an acquisition time of 26.9 seconds.

### *Texture analysis*

After obtaining the images of each CBCT cap from all groups, the images in their DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) format were exported to the OnDemand3D software (Cybermed, Seoul, South Korea). In this, three axial sections of the defect were then obtained, one superior, one intermediate and one inferior, which were exported using the “capture” tool in bitmap (.bmp) format, to be analyzed by the MaZda 4.60 software. (Institute of Electronics, Technical University of Lodz, Poland). This one consists of a specific package for image texture analysis (TA). Each axial slice previously chosen in its bitmap format was exported to the

MaZda 4.60 software and then, using the “draw polygon” tool, the region of interest (ROI) was delimited, corresponding on the bone defect to be analyzed by the program.

The MaZda 4.60 software can make variations in the coordinates in the spatial relationship of the components of this matrix and thus determining the frequency of different information regarding the analyzed pixel values. For this, the software allows selecting specific parameters, which have an interpretation meaning that will translate the behavior of that analyzed tissue, thus providing the values for TA. In this study, the following parameters calculated from the Co-occurrence matrix (COM) were analyzed<sup>15</sup>:

- a) secondary angular momentum (AngScMom) - measures the uniformity (or order) of the distribution of gray levels in the image. Images with fewer gray levels have greater uniformity;
- b) Contrast - represents the amount of local variation in gray levels. A high value of this parameter can indicate the presence of edges, noise or wrinkles in the image;
- c) correlation (Correlat) – measures the linear dependence of gray levels between neighboring pixels. Provides a measure similar to autocorrelation methods;
- d) Sum of Squares (SumOfSqs) – measure of the dispersion (in relation to the mean) of the distribution of gray levels (variance);
- e) Moment of Inverse Difference (InvDfMom) – measures the smoothness (homogeneity) of the distribution of gray levels in the image. If the contrast value is low the InvDfMoM value is high;
- f) Sum entropy (SumEntrp) – measure of the dispersion (in relation to the mean) of the distribution of the sum of the gray levels of the image;
- g) *Entropy* – measures the degree of clutter between pixels in the image. Images with more gray levels have greater entropy.
- h) sum of averages (SumAverg) – measures the distribution of gray levels, a higher value translates into an image with less uniformity;
- i) sum of variances (SumVarnc) – measures the dispersion of the distribution of gray levels, a higher value gives rise to a less uniform image;
- j) difference of variances (DifVarnc) – measures the degree of scattering of gray tones, a higher value translates to a less uniform image;
- k) entropy difference (DifEntrp) – like entropy, it measures the degree of disorder between pixels in the image, but in a more generalized way. A higher value corresponds to an image of lower uniformity.

The values of the parameters obtained by the texture analysis, for each axial cut, were tabulated and for each parameter an average of the three obtained cuts was made. This average value corresponds to the analyzed value, this was performed to obtain values that cover a larger area of the image corresponding to the bone defect in each cap.

#### *CBCT for volume analysis*

To analyze the volumes of each defect, all CBCT images, in their DICOM format, were exported to the ITK-Snap® software (Kitware, New York, USA). In this software, the defect region was isolated, through ROI tool, using the three planes in MPR mode: axial, coronal and sagittal. Then, using the semi-automatic segmentation tool, the structure for segmentation - the bone defect - was identified using the Thresholding screen and inside it, seeds (or bubbles) were implanted to progressively fill the entire defect. After the segmentation process, the software will generate a three-dimensional model (3D) and a table in which the volumetry in mm<sup>3</sup> of this structure will be displayed.

#### *Histomorphometric analysis*

The microscopic analysis was performed by capturing images of the slides using an Axiophot2 light microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to an AxioCamMRc 5 digital camera (Carl Zeiss Oberkochen, Germany) that transmits them to the AxioVision Release 4.7.2 computer program. The images were captured and blinded and later analyzed by another properly calibrated examiner. The analysis was initially performed at low magnification to have a global view of the sections and later enlarged to observe the details of each area and thus carry out a quantitative analysis of the bone tissue. The histomorphometric measurements were made from photomicrographs obtained using the AxioVision Release 4.7.2 computer program.

#### Histomorphometric parameters:

The original total area (AT) of the size of the defect was initially measured. for this, the external and internal surfaces of the calvaria defect were first identified, as well as the right and left reversal lines where the trephine removed the bone, with a total distance of 5 mm. The area inside these lines was the defect area.

- a) area of new bone formation (ANO): Areas of new bone formation were measured from the right and left edges of the defect;
- b) remaining area of the defect (ARD): It was obtained by AT – ANO (subtraction of those);

- c) distance between the edges of newly formed bone (LINEAR).

### *Statistical analysis*

The histomorphometric data were submitted to statistical analysis using the computer programs Minitab (Minitab® 18.1) and GraphPad Prism (Version 6.01). The normality was tested by the Shapiro-Wilk test and, in the case of being parametric, the descriptive analysis consisted of the calculation of means and standard deviation and the inferential statistics were performed through analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test to verify statistical differences. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post test were performed. In both cases, the significance level adopted was 5%.

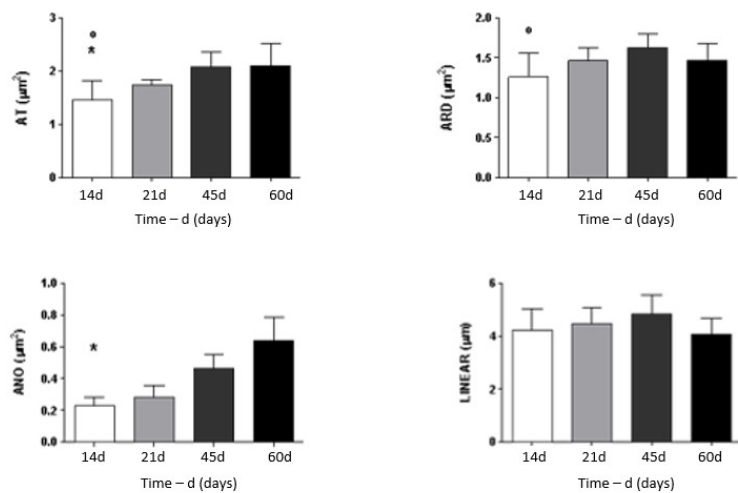
Regarding the statistical analysis of the CBCT images, exploratory data analysis was performed through summary measures (mean, standard deviation, median, minimum and maximum) and graph construction. Spearman's correlation coefficient was used to assess the correlation between texture variables and to select the variables for analysis. To compare times and groups, ANOVA models were used considering Group, Time and interaction between Group and Time as sources of variation. In models in which the p-value of the interaction was significant, a model was built for each group, comparing the times and another model for each time, comparing the groups. In these cases, the p-values were adjusted by the Bonferroni method. As the variables did not show normal distribution, both the volume and the texture parameters were transformed into ranks in the ANOVA models. The significance level adopted was 5%.

### *Results*

#### *Intragroup histomorphometric analysis*

The results of the CG revealed that, for the AT variable, there was a statistically significant difference between the times of 14 and 45, 60 days; for the ANO parameter, a statistically significant difference could be observed between the times of 14 days and 60 days. Regarding ARD, there was a statistically significant difference between the times of 14 days and 45 days. Finally, in the LINEAR variable there was no statistically significant difference between all times in this group. (Figure 1).

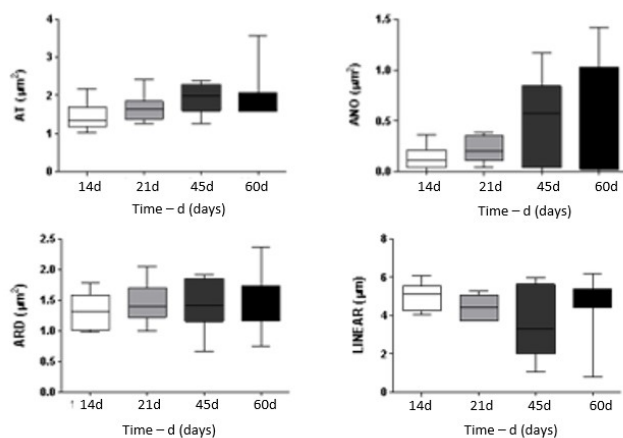
Figure 1 – Intragroup comparisons (CG)



Legend: Intragroup comparisons of GC. One way – ANOVA, Tukey test  $p < 0.05$ . \* 60 days and  $\circ$  45 days.

In GT1h, the variables AT, ANO, ARD and LINEAR showed no statistically significant difference between the times studied (Figure 2).

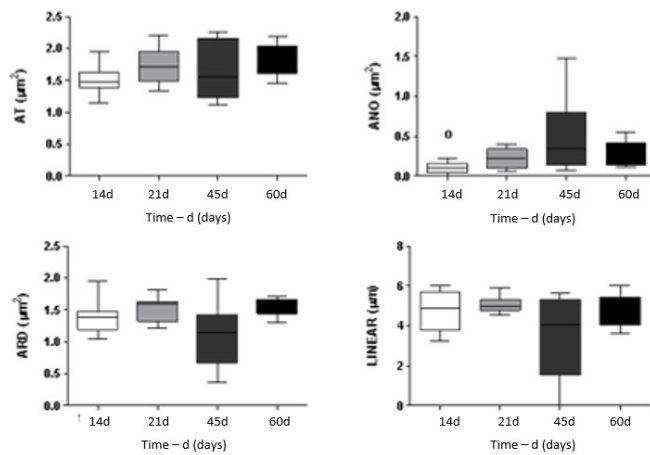
Figure 2 – Intragroup comparisons (GT1h)



Legend: Intragroup comparisons of GT1h, Kruskal-Wallis test  $p > 0.05$ .

In GT3h, the variables AT, ARD and LINEAR did not present a statistically significant difference, whereas in the variable ANO it is possible to observe a statistically significant difference between the times of 14 days and 45 days (Figure 3).

Figure 3 – Intragroup comparisons (GT3h)

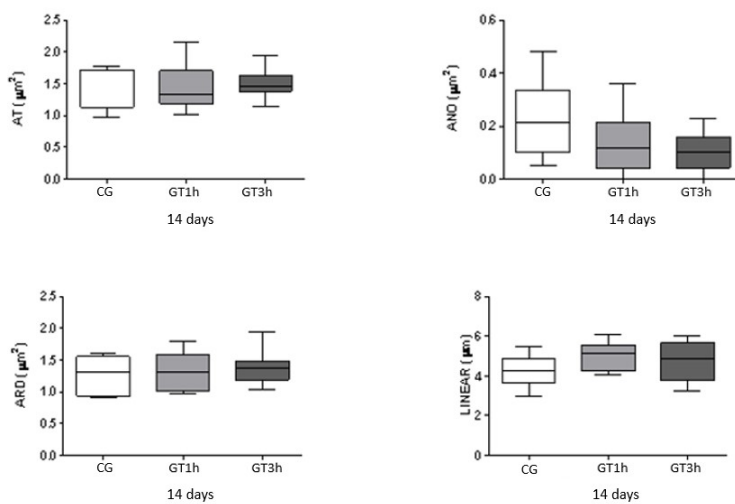


Legend: Intragroup comparisons of GT3h. Kruskal-Wallis, Dunn's test.

### *Intergroup histomorphometric analysis*

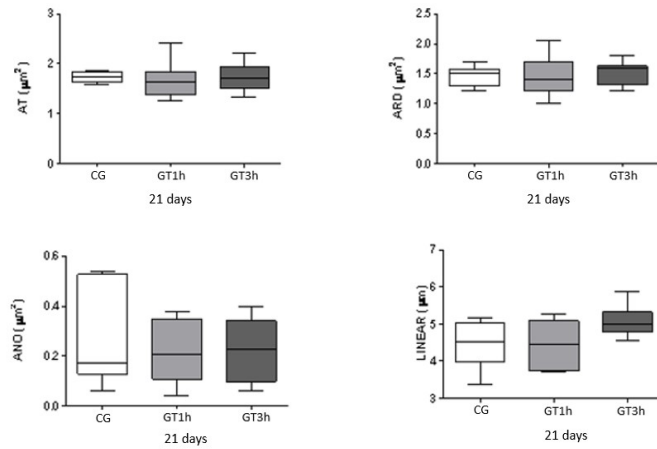
The intergroup histomorphometric analysis, performed using the Kruskal-Wallis test, revealed that there was no statistically significant difference between the three groups in the four periods studied (Figures 4, 5, 6 and 7).

Figure 4 – Intergroup comparisons at 14 days



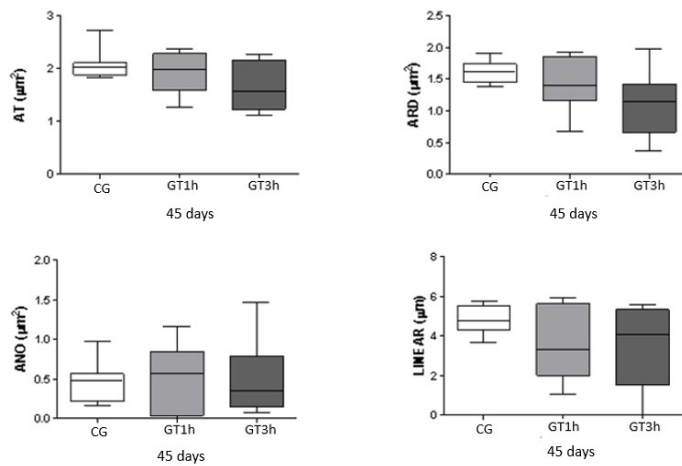
Legend: Intergroup comparisons for the variables AT, ANO, ARD and LINEAR in the period of 14 days. Kruskal-Wallis test  $p > 0.05$ .

Figure 5 – Intergroup comparisons at 21 days



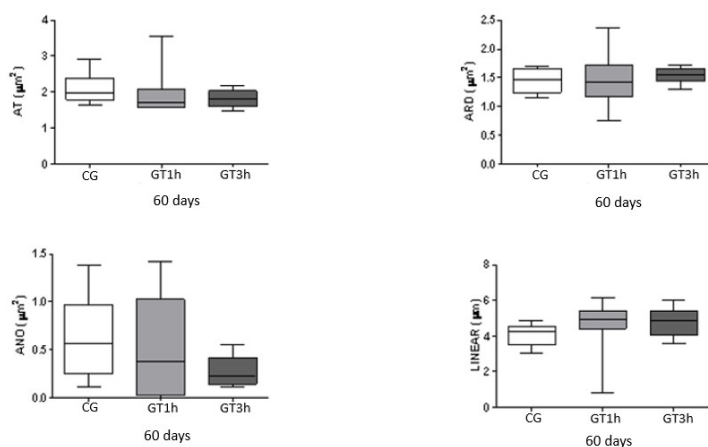
Legend: Intergroup comparisons for the variables AT, ANO, ARD and LINEAR in the period of 21 days. Kruskal-Wallis test  $p > 0.05$ .

Figure 6 – Intergroup comparisons at 45 days



Legend: Intergroup comparisons for the variables AT, ANO, ARD and LINEAR in the period of 45 days. Kruskal-Wallis test  $p > 0.05$ .

Figure 7 – Intergroups comparisons at 60 days



Legend: Intergroup comparisons for the variables AT, ANO, ARD and LINEAR in the period of 60 days. Kruskal-Wallis test  $p > 0.05$ .

### *CBCT analysis*

In relation to the AT of the CBCT images, a total of 11 parameters were initially selected, in 12 different directions, thus totaling 132 variables. In addition to the variables related to the AT parameters, the variation in the volume of bone defects was also studied, thus totaling 133 variables. Due to this high number of variables, and, consequently, the greater number of statistical tests, the error of the final analysis would be increased, and, therefore, the option of reducing the total number of these variables was considered. In order to do that, the Spearman correlation coefficient was calculated between the different directions of the same AT parameter and between those within the S(1.0) direction. There was a very strong correlation between the directions of the same texture parameter, except for the Correlation one. Therefore, it was concluded that the information obtained in one direction is the same as that in the other directions, thus, the comparisons were performed only in 01 direction (S1,0)), thus avoiding greater possibility of error in the analysis.

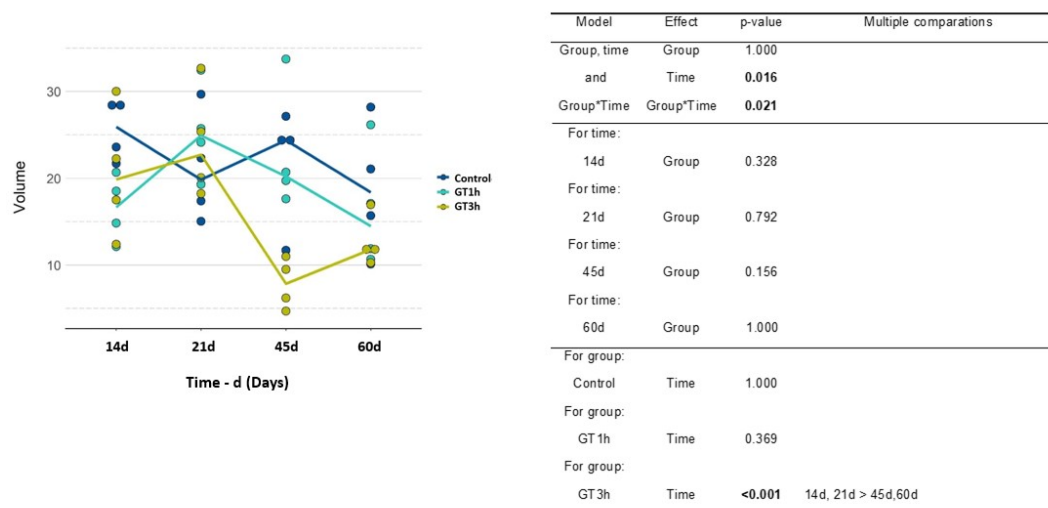
A high correlation can be observed between some of the texture parameters within the S(1,0) direction. It was considered that texture parameters with Spearman correlations greater than or equal to 0.8 or less than or equal to -0.8 are strongly correlated and, therefore, provide the same information for comparisons between the groups (CG, GT1h and GT3h) and the times considered (14d, 21d, 45d and 60d). Therefore, it was decided to carry out the analysis only with the following texture

parameters: Contrast S(1,0); SumAverg S(1,0); Entropy S(1,0) and all Correlation directions.

In this way, the results related to the analysis of the volume and other parameters - mentioned above - will be presented. So, for each parameter, there will be one figure, which show the descriptive measures related to that variable (parameter) of each group and each time considered; and comparison results between groups and times. When a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between groups or time was observed, a multiple comparison was then performed and the results are also presented in this figure.

For the defect volumes, a significant interaction between group and time was observed, therefore the comparison was performed by group and by time. Comparing the groups at each time point, no statistically significant difference was observed between the groups at any of the times. Comparing the times per group, a statistically significant difference was observed between the times of the GT3h group. Times 14d and 21d had larger volumes than times 45d and 60d (Figure 8).

Figure 8 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the volumes of bone defects. P-value of effects by model for volumes



For the texture parameter Contrast S(1.0), a significant interaction between group and time was observed, therefore the comparison was performed by group and also by time. Comparing the groups at each time point, no statistically significant difference was observed between the groups at any of the times. Comparing the times per group, a statistically significant difference was observed between the times in all groups. In CG, time 60d had a higher value than times 14d and 21d. In GT1h group, times 45d and 60d showed higher values than time 14d. In GT3h, times 45d and 60d had higher values than time 14d and time 60d had a higher value than time 21d (Figure 9)

Figure 9 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Contrast S(1.0). P-value of effects per model for the same parameter.

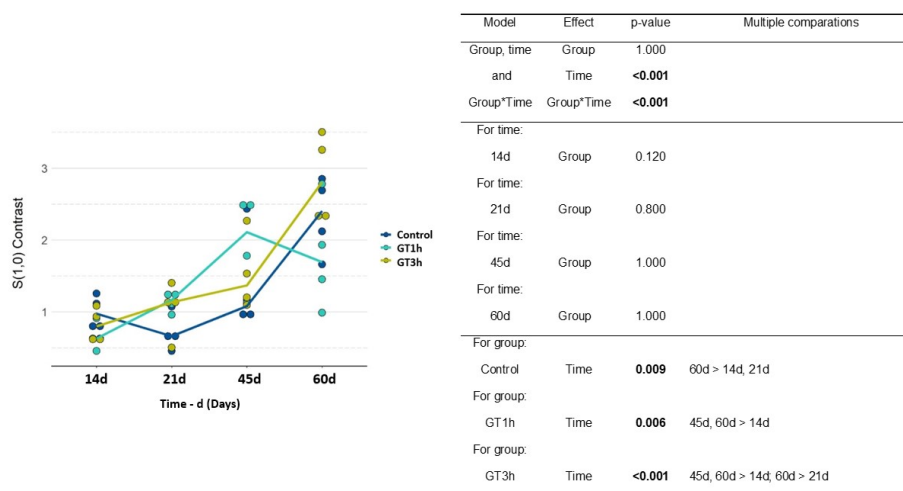
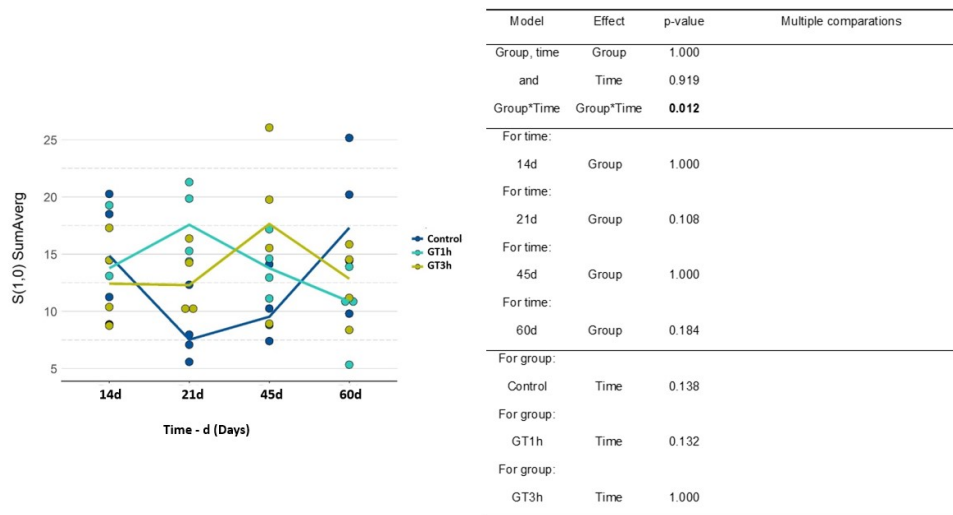


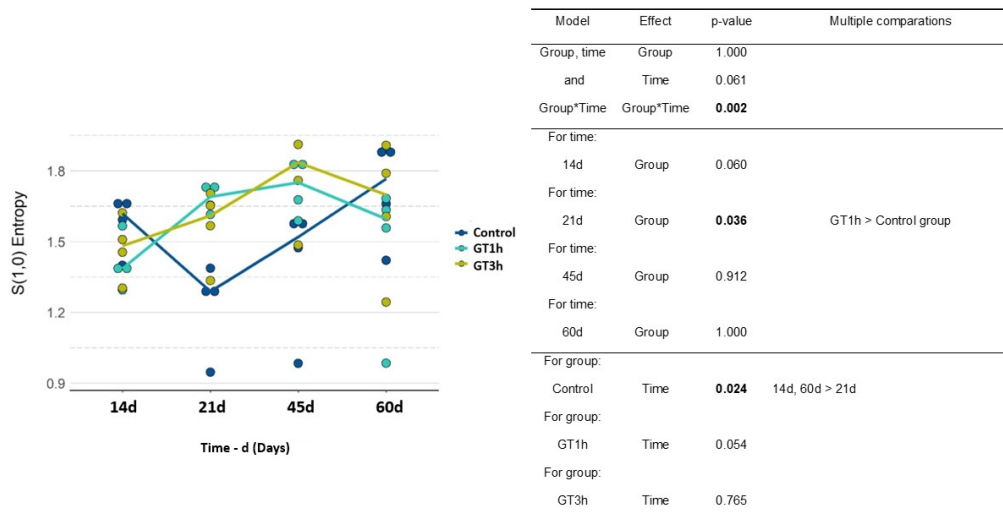
Figure 10 displays the results relative to the texture parameter SumAverg S(1,0).

Figure 10 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter SumAverg S(1,0). P-value of effects per model for the same parameter



For the texture parameter Entropy S(1.0), a significant interaction between group and time was observed, therefore the comparison was performed by group and also by time. Comparing the groups at each time, a statistically significant difference was observed between the groups at time 21d. GT1h presented a higher value than the CG. Comparing the times per group, a statistically significant difference was observed between the times in the CG. Times 14d and 60d had a higher value than time 21d (Figure 11).

Figure 11 - Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Entropy S(1.0). P-value of effects per model for the same parameter



Figures 12 to 21 show the results for the texture parameter Correlation S(1.0), S(0.1), S(1.1), S(1,-1), S(2.0), S (0.2), S(2,2), S(2,-2), S(3.0), S(0.3), S(3.3), S(3,-3), progressively. For this parameter, no statistically significant differences were observed between groups and between times, considering all directions.

Figure 12 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(1.0). P-value of effects per model for the same parameter

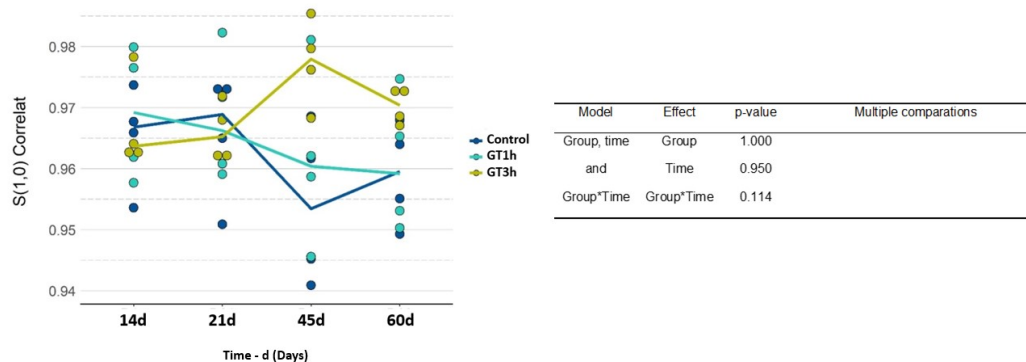


Figure 13 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(0,1). P-value of effects per model for t same parameter

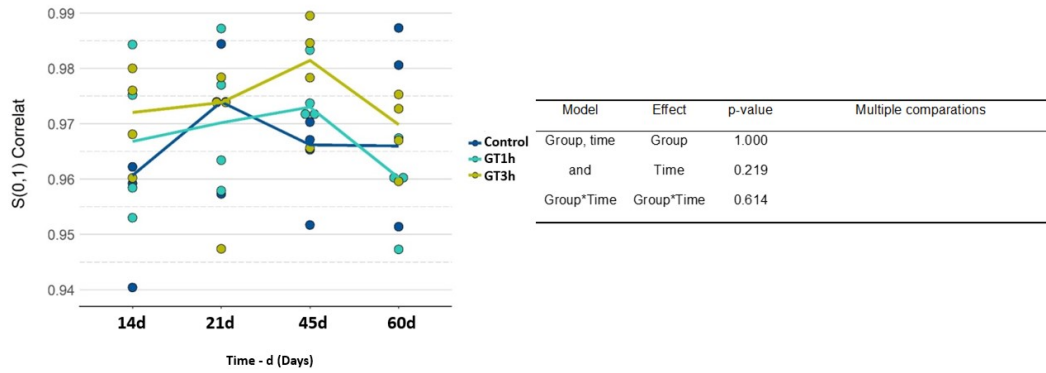


Figure 14 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(1,1). P-value of effects per model for the same parameter

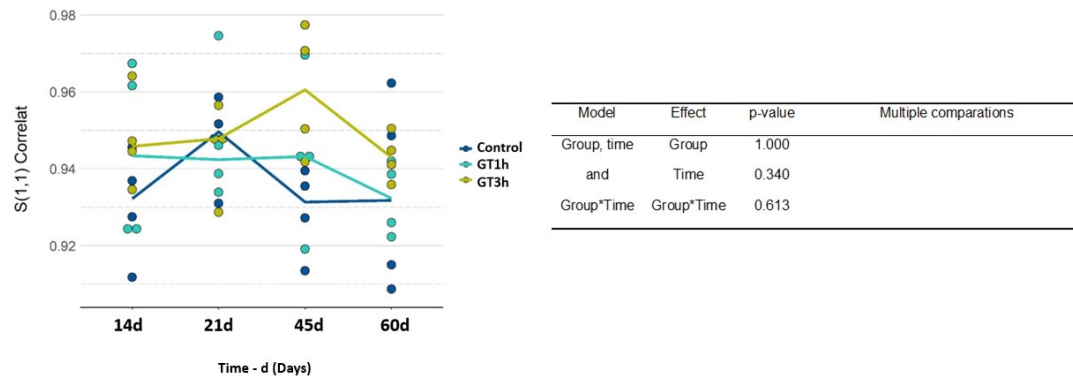


Figure 15 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(1,-1). P-value of effects per model for the same texture parameter

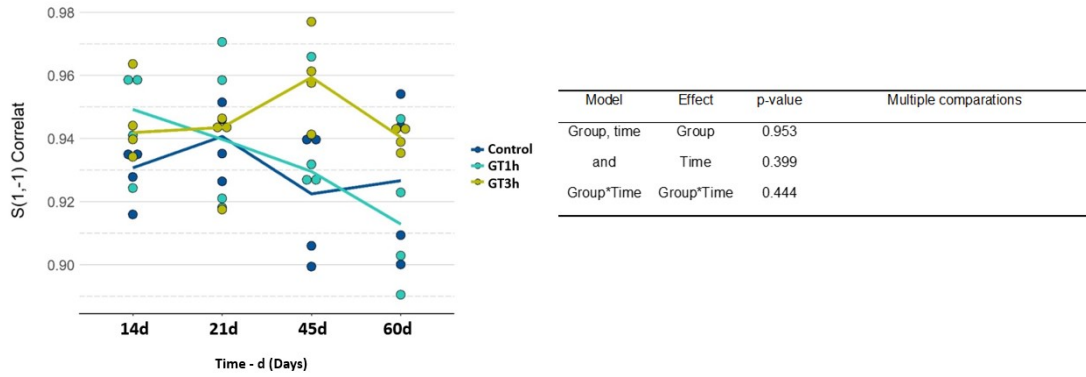


Figure 16 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(2,0). - P-value of effects per model for the same parameter

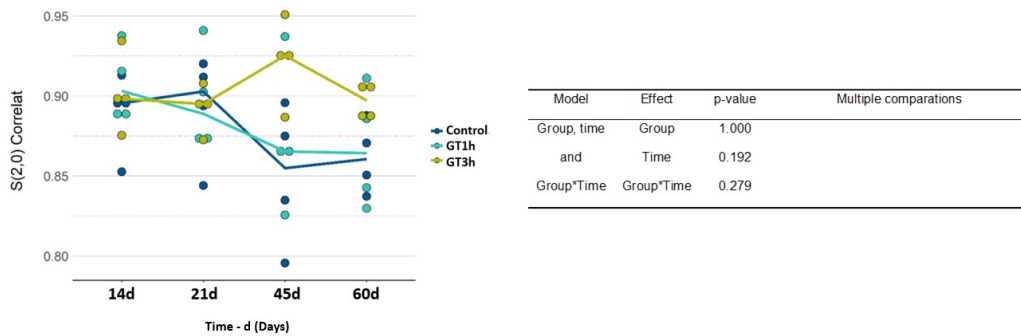


Figure 17 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(0,2). P-value of effects per model for the same parameter

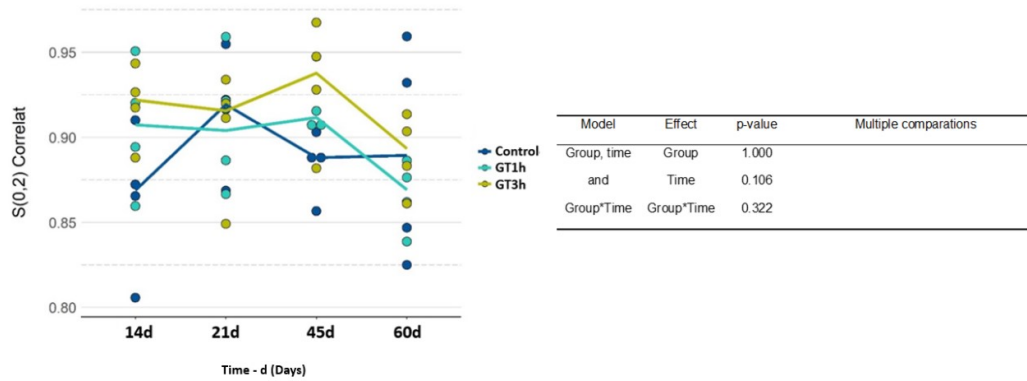


Figure 18 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(2,2). P-value of effects per model for the same parameter

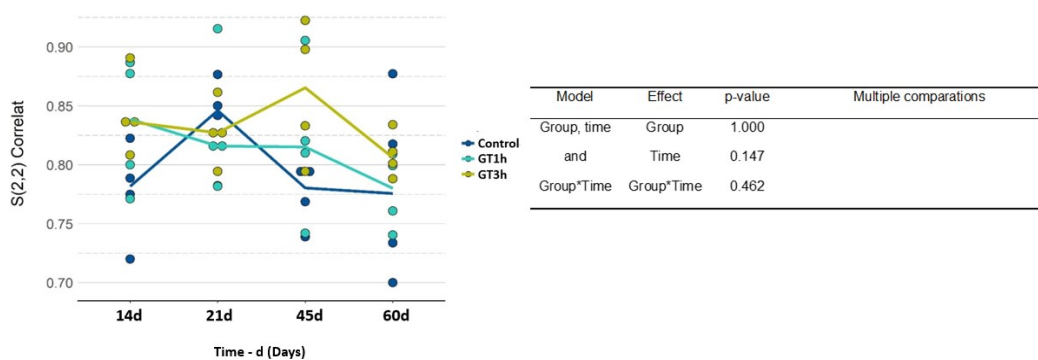


Figure 19 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(2,-2). P-value of effects per model for the same texture parameter

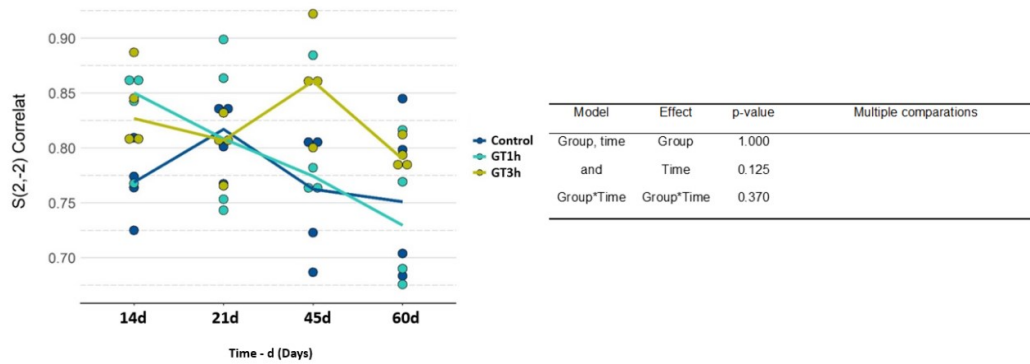


Figure 20 – Graph with individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(3,0). P-value of effects per model for the same parameter

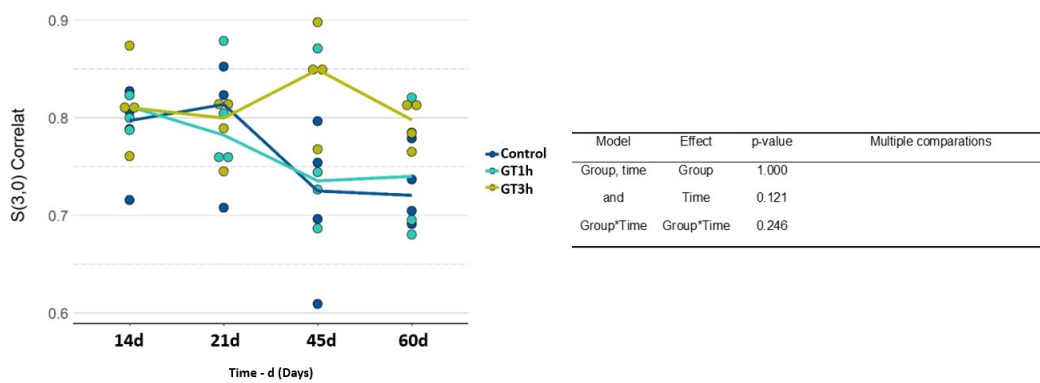
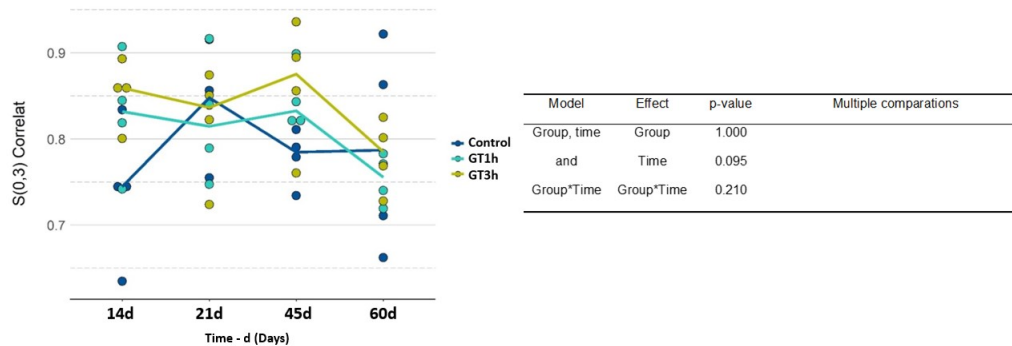


Figure 21 – Graph with the individual measurement of each animal (points) and median (line) per group and time for the texture parameter Correlation S(0.3). P-value of effects per model for the same parameter



## Discussion

The present study investigated the effectiveness of two protocols with different times of application of PEMF in bone repair in a model of critical defect in the calvaria of rats. Although several studies have demonstrated the great potential of PEMFs in the treatment of bone repairs,<sup>6,7,16</sup> in the present study it was not possible to demonstrate a potential benefit, confirmed both histologically and tomographically. Intergroup histomorphometric analysis revealed that there was no statistically significant difference between both groups that received PEMF therapy and the CG in all periods and for all variables studied. A possible explanation for this result would be the choice of parameters related to the PEMF device (frequency, intensity, waveform and duration of exposure), as the characteristics and different combinations of these parameters seem to play an important role in the type of biological response generated<sup>17</sup>. In fact, the literature shows great heterogeneity between the methodologies used and standards related to PEMFs. The lack of a gold standard protocol, which would maximize the potential effects of PEMF on bone repair, could explain the high variability in the effectiveness of this treatment modality in several studies.

A study that exemplifies this variability of results is the one that evaluated the bone repair of a critical size fibular osteotomy in fifteen rats, which were divided into two distinct groups characterized by different frequencies and intensities of applied

electromagnetic field<sup>14</sup>. In the first group, the frequency adopted was 15 Hz and an electromagnetic field of 2 mT (Physio-Stim signal); in the second group, a frequency of 1.5 Hz and an induced magnetic field of 0.02 mT (Osteo-Stim signal) were implemented. The duration of exposure was 3h/day for 7 days a week. The contralateral limb was used as a control in both groups. The results showed better bone filling and consolidation in the Physio-Stim group, which was not observed for the Osteo-Stim group. Thus, it can be deduced that different types of electromagnetic fields exert different effects on bone healing.

Another study that shows this relationship between the parameters related to PEMF and its biological effect is the one that evaluated the bone defect repair mechanisms in the femur of rats, which were subjected to stimulation with PEMF at a frequency of 15 Hz for 2 h/day for 7 days.<sup>18</sup> The animals were divided into three groups, differing in the applied electromagnetic field intensities (1 mT, 5 mT and 10 mT), besides the control group. The results showed a significant increase in bone mineral density after 21 days only in the animals treated with intensities of 5 mT and 10 mT, suggesting that this parameter may also have a great influence on the bone deposition rate.

Furthermore, there are practically no *in vivo* studies of calvaria defect stimulated by PEMF. Many of them are performed in long bones, which have a pattern of ossification mainly endochondral, unlike the calvaria, whose pattern is mainly intramembranous<sup>1</sup>. Thus, important differences between them - at the molecular, cellular and tissue levels (such as differences in gene expression, inflammatory and the presence of unique tissues in the calvaria, such as dura mater, pericranium and sutures) - are reported in the literature,<sup>19</sup> which may represent important variables in the response to the PEMF stimulus, therefore they should be better evaluated in future studies.

In our study, intragroup histomorphometric analysis revealed that, for the 1h PEMF protocol, there was no statistically significant differences between all periods and for all variables studied. So, we can deduce that, within the limitations of this study, the exposure time protocol of this group did not show a positive effect on bone healing, unlike the CG, because if we analyze this group separately, for the ANO parameter it was possible to observe a greater bone neoformation, statistically significant, in the period of 60 days compared to the period of 14 days. Thus, not using PEMF appeared to be more beneficial than using it in the 1h application protocol.

Regarding the intragroup histomorphometric analysis of the 3h PEMF protocol, the results showed a statistically significant higher bone formation (ANO), between the periods of 14 and 45 days - which contrasts again with the result obtained by the 1 hour PEMF protocol, in which it was not possible to demonstrate this statistically

significant difference between the periods - This results corroborates with the ones related to CBCT volume, where it was possible to observe that for GT3h, the defect presented higher values in the initial periods (14d and 21d ) when compared to more advanced periods of bone healing (45d and 60d). Thus, it can be inferred that this smaller volume of the defect in this period could reflect a higher rate of bone formation in this region.

In relation to CBCT volume analysis, our results showed that there were no statistically significant differences between all groups, but in GT3h, the longer the time, the smaller volume was observed. This result indicates that there was a greater reduction in the total volume of the defect, which means more formation of repair tissue in the case of application of PEMF for a longer time (3h) and for this group, the longer the time – over 45 days - after PEMF application, the greater closure of the defect was observed. Therefore, we can say that, in those situations in which an application of an EMFs is chosen as an adjuvant factor for bone healing (3h protocol), time is a factor to be considered, and therefore, a longer time should be needed.

In the cases of no application (CG) and PEMF application for a shorter time (1h) the time factor does not seem to have a significant influence on the volume of the defect, which at first seems antagonistic, once it is expected that more time has elapsed, greater is the chance of repairing the defect. However, in the CG, for the different times considered – 14d, 21d, 45d and 60d – the volume values oscillate in a range between 17 to 27 and in the GT1h, between 15 to 25 - with alternating periods of greater and lesser volume, which may reflect a dynamic process of oscillation on osteogenesis and bone resorption, resulting at the end (60d) in lower values of the variation range. So, a longer time, in fact, reduces the volume of the defect. This finding indicates that there is a more drastic reduction of the volume, after 45 days, when an EMFs is applied for 3h and the resulting volumes in these cases are numerically smaller than those with the same repair time related to no application (CG) or PEMF application for less time (1h).

In order to make a qualitative analysis of the repair tissue, the TA technique was performed in the CBCT images. This technique uses mathematical parameters that allow the distinction of subtle differences between tissues, which cannot be detected by visual inspection methods of the images. The TA parameters characterize the differences obtained in the gray scale between the pixels of a predetermined region of interest (ROI) of the image, which are reflections of the physical properties of these tissues in that region.

Analyzing our results, for the Contrast parameter, despite not having shown statistically significant differences between the groups, it presented higher values in

each of the 03 groups - CG, GT1h and GT3h - in those cases, the greater repair time, the greater contrasts values were observed. The 60 days' time presented the higher values, which statistically differed between the other times, in each group. The significance of high Contrast values in the TA of CBCT images indicates the presence in the images of a high noise and irregularities, which can translate a non-homogeneous configuration to the newly formed bone<sup>20</sup>. This finding seems interesting, since even if there is a longer repair time, and consequently more bone formation, the TA indicated that the quality of this could not be considered as a favorable standard, since the bone trabeculae could be arranged, for example, in irregular spatial configurations, as indicated by this parameter. In fact, a previous study,<sup>21</sup> which analyzed, through TA, the alveolar bone quality of dental implant placement sites, correlating with their stability, indicated that high values of this parameter were found (Contrast) in the bone of implants that presented lower torque values in their installations. This corroborates the finding that the Contrast could indicate that the quality of the newly formed bone tissue was irregular and could reflect less favorable characteristics.

In our study, for the 03 groups, the time that presented lower Contrast values corresponded to 14 days, noting that in the groups where the electromagnetic field was applied – GT1h and GT3h – in addition to the 60d time, the 45d time also had high contrast values, unlike the CG. This possible means a negative effect of the EMF when it was applied, since the disorganization of the type of neo formed tissue increased with the repair time. This finding is interesting, as would be expected the opposite to occur, but the results shows PEMF could alter the pattern of the formed bone.

The second texture parameter, among those analyzed in this study, which presented statistically significant differences was the Entropy one. As the numerical values of the pixels, translated as gray levels of the image, reflect the degree of attenuation of the X-ray beam of that tissue, it can be said that this greater randomness (high Entropy) reflects different degrees of mineralization in this tissue. It was observed, by our results, differences in times between all groups - CG, GT1h and GT3h - in relation to the 21d time, which GT1h presented higher values compared to CG and within this one, statistically significant differences were also identified between times, which 60d showed higher values. Thus, when analyzing the repair tissue, related to Entropy, at time 21d the EMF applied in the protocol of the GT1h seemed to change the pattern of the degree of mineralization of this tissue, making it less uniform compared to CG (in which EMF was not applied). In addition, considering only this group without the application of the EMF, it is observed again that a longer time (60d) evokes in a less uniform tissue - greater Entropy - which corroborates with the results related to the Contrast parameter previously discussed.

Another study evaluated the use of the TA technique to delineate healthy tissues and other tissues affected by furcation lesions in molars on CBCT images<sup>22</sup> and the authors concluded that tissue that visually appeared healthy on images in border regions of furcation lesions had showed higher Entropy values than healthy alveolar bone tissues, indicating that this parameter acted as a bone marker in the images to delimit these lesions and the regions surrounding these ones showed changes in degrees of mineralization. These findings complement those observed here, indicating that the EMF, applied with the GT1h protocol, could, after 21 days, change the degree of mineralization of the neoformed tissue, making it less uniform and that a greater number of days (60d) for cases in which there was no application of the field — CG - would also reflect in the alteration of this mineralization – translated by the increase of its Entropy.

A future challenge, in relation to these findings, in CBCT images by TA, would be to determine a correct time of application of PEMFs to obtain, not only a resolution of the defects, but also a degree of uniformity regarding its architecture (measured by Contrast) and its mineralization (measured by Entropy), correlating these 02 parameters to specific laboratory tests to measure the bone quality of this tissue, in order to prove to what extent these parameters would actually influence the final qualitative result of the repair bone. In this context, future studies can be developed, with a greater number of samples, groups and times, however, our results are important, as they demonstrate that the TA technique can be an adjuvant in the evaluation of repairs of bone defects, submitted to EMF, especially when considering the current reality of the use of CBCT in dental practice as a complementary exam frequently requested in bone analysis in the maxillofacial complex.

### *Conclusion*

Within the limitations of our study, we concluded that the two protocols used were not effective in accelerating bone repair in CBD in rat's calvaria. Besides that, the characteristics of the parameters (intensity, frequency, amplitude, duration and time exposure) should be considered in future studies as important variables that can alter the effects of PEMF and, thus, searching for the ideal protocol that maximizes its effectiveness. Furthermore, as there are practically no studies *in vivo* of PEMF in the region of the calvaria, it should be better investigated regarding its role to the EMF stimulus and the molecular, cellular and tissue mechanisms involved in this process.

## References:

1 - Huang EE, Zhang N, Shen H, Li X, Maruyama M, Utsunomiya T, Gao Q, Guzman RA, Goodman SB. Novel Techniques and Future Perspective for Investigating Critical-Size Bone Defects. *Bioengineering (Basel)*. 2022 Apr 11;9(4):171. doi: 10.3390/bioengineering9040171. PMID: 35447731; PMCID: PMC9027954.

2 - Nunes CMM, Ferreira CL, Bernardo DV, Oblack GB, Longo M, Santamaria MP, et al. The influence of LLLT applied on applied on calvarial defect in rats under effect of cigarette smoke. *J Appl Oral Sci*. 2019;27:1–10. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0621.

3 – Hu H, Yang W, Zeng Q, Chen W, Zhu Y, Liu W, Wang S, Wang B, Shao Z, Zhang Y. Promising application of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) in musculoskeletal disorders. *Biomed Pharmacother*. 2020 Nov;131:110767. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110767. Epub 2020 Sep 23. PMID: 33152929.

4 - Lullini G, Cammisa E, Setti S, Sassoli I, Zaffagnini S, Marcheggiani Muccioli GM. Role of pulsed electromagnetic fields after joint replacements. *World J Orthop*. 2020 Jun 18;11(6):285-293. doi: 10.5312/wjo.v11.i6.285. PMID: 32572365; PMCID: PMC7298453.

5- Peng L, Fu C, Xiong F, Zhang Q, Liang Z, Chen L, He C, Wei Q. Effectiveness of Pulsed Electromagnetic Fields on Bone Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Bioelectromagnetics*. 2020 Jul;41(5):323-337. doi: 10.1002/bem.22271. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32495506

6 - Lin CC, Chang YT, Lin RW, Chang CW, Wang GJ, Lai KA. Single pulsed electromagnetic field restores bone mass and microarchitecture in denervation/disuse osteopenic mice. *Med Eng Phys*. 2020 Jun;80:52-59. doi: 10.1016/j.medengphy.2019.10.004. Epub 2020 May 4. PMID: 32376078.

7 - Qiu XS, Li XG, Chen YX. Pulsed electromagnetic field (PEMF): A potential adjuvant treatment for infected nonunion. *Med Hypotheses*. 2020 Mar;136:109506. doi: 10.1016/j.mehy.2019.109506. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31841766.

8 - Wang L, Xie S, Zhu S, Gao C, He C. Efficacy of Pulsed Electromagnetic Fields on Experimental Osteopenia in Rodents: A Systematic Review. *Bioelectromagnetics*. 2021 Jul;42(5):415-431. doi: 10.1002/bem.22348. Epub 2021 May 18. PMID: 34004034.

9 - Yuan J, Xin F, Jiang W. Underlying Signaling Pathways and Therapeutic Applications of Pulsed Electromagnetic Fields in Bone Repair. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1581–94. doi: 10.1159/000489206.

10 - Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, Harrison BS. 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. PMID: 26042793; PMCID: PMC4516580.

- 11 – Nunes CMM, Ferreira CL, Bernardo DV, Lopes CCR, Collino L, da Silva Lima VC, de Camargo Reis Mello D, de Vasconcellos LMR, Jardini MAN. Evaluation of pulsed electromagnetic field protocols in implant osseointegration: in vivo and in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2020 Oct 9. doi: 10.1007/s00784-020-03612-x. Epub ahead of print. PMID: 33033921.
- 12 - 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.
- 13 – 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. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24764277
- 14 - Midura RJ, Ibiwoye MO, Powell KA, Sakai Y, Doehring T, Grabiner MD, Patterson TE, Zborowski M, Wolfman A. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. *J Orthop Res*. 2005 Sep;23(5):1035-46. doi: 10.1016/j.orthres.2005.03.015. PMID: 15936919.
- 15 - Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*. 1973;3:610-62
- 16 – 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. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28965919.
- 17 - Hiie Hinrikus, Jolanta Karpowicz & Jonne Naarala (2018) Special Issue: Electromagnetic fields in biology and medicine, *International Journal of Radiation Biology*, 94:10, 873-876, DOI: 10.1080/09553002.2018.1533359
- 18 - Liu Y, Hao L, Jiang L, Li H. Therapeutic effect of pulsed electromagnetic field on bone wound healing in rats. *Electromagn Biol Med*. 2021 Jan 2;40(1):26-32. doi: 10.1080/15368378.2020.1851252. Epub 2020 Nov 29. PMID: 33251878
- 19 - wang, D.; Gilbert, J.R.; Zhang, X.; Zhao, B.; Ker, D.F.E.; Cooper, G.M. Calvarial versus long bone: Implications for tailoring skeletal tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev*. 2020, 26, 46–63.
- 20 - Nussi AD, de Castro Lopes SLP, De Rosa CS, Gomes JPP, Ogawa CM, Braz-Silva PH, Costa ALF. In vivo study of cone beam computed tomography texture analysis of mandibular condyle and its correlation with gender and age. *Oral Radiol*. 2022 May 18. doi: 10.1007/s11282-022-00620-3. Epub ahead of print. PMID: 35585223

21 - Costa ALF, de Souza Carreira B, Fardim KAC, Nussi AD, da Silva Lima VC, Miguel MMV, Jardini MAN, Santamaria MP, de Castro Lopes SLP. Texture analysis of cone beam computed tomography images reveals dental implant stability. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2021 Dec;50(12):1609-1616. doi: 10.1016/j.ijom.2021.04.009. Epub 2021 May 4. PMID: 33962826.

22 - Gonçalves BC, de Araújo EC, Nussi AD, Bechara N, Sarmento D, Oliveira MS, Santamaria MP, Costa ALF, Lopes S. Texture analysis of cone-beam computed tomography images assists the detection of furcal lesion. *J Periodontol.* 2020 Sep;91(9):1159-1166. doi: 10.1002/JPER.19-0477. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32003465.

## ANEXO A — Certificado do comitê de ética


 CERTIFICADO  
 CEUA – Comissão de Ética no  
 Uso de Animais

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo registrado sob o nº 10/2020, intitulado:- Efeito do campo eletromagnético pulsado na reparação de defeito ósseo crítico na calota de ratos, sob a responsabilidade de MARIA APARECIDA NEVES JARDINI, tendo como colaboradoras:- Camila Moretto Magnoni Nones, Camila Ferreira Lopes, Victória Clara da Silva Lima e Nicole Berton de Moura, 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 19/10/2020.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	19/10/2020 a 19/12/2022
Espécie/linhagem/raça	Ratas Heterogênico Wistar
Nº de Animais	96 ratos
Peso/idade	60 dias / 300 grs.
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Alterações	<b>Em 18/10/2021, foi excluído o nome da Colaboradora Caroline Denóbi de Moraes e incluído o nome da nova Colaboradora NICOLE BERTON DE MOURA.</b>

São José dos Campos, 18 de outubro de 2021



Profa.Dra ANDREA CARVALHO DE MARCO  
 COORDENADORA/CEUA