



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

CAMILLA MAGNONI MORETTO NUNES

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CAMPO
ELETROMAGNÉTICO PULSADO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE
IMPLANTES: estudo *in vivo* e *in vitro***

2020

CAMILLA MAGNONI MORETTO NUNES

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CAMPO ELETROMAGNÉTICO
PULSADO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES: estudo *in vivo* e *in vitro***

Tese 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 DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e reparação tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim

São José dos Campos

2020

BANCA EXAMINADORA

Profa Assoc Maria Aparecida Neves Jardim (Orientador)
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
Campus de São José dos Campos

Prof Dr Oscar Fernando Munõz Chavéz
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia
Campus de Araraquara

Profª Drª Luciana Saraiva
Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Campus de São Paulo

Profª Drª Andréa Carvalho de Marco
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
Campus de São José dos Campos

Profª Drª Ana Paula de Souza Faloni
Universidade de Araraquara
Faculdade de Ciências Odontológicas
Campus de Araraquara

São José dos Campos, 04 de Março de 2020.

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus por me ajudar e possibilitar a conquista de mais um sonho. Por ser minha força, minha rocha, a calma e o suporte quando precisei. Minha gratidão por toda capacitação, pela inspiração em minhas atividades e pela fé em um Deus tão grande que está tão perto, que cuida de cada passo da minha vida. Toda honra e glória ao Senhor Jesus.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Cláudia e Pedro, pelos valores que me ensinaram e que me abriram muitas portas.

Aos meus filhos Letícia e Gabriel pela paciência e compreensão.

Ao meu marido Guilherme pelo incentivo e apoio.

À minha querida orientadora e amiga Prof^a Ucha pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, pela confiança nas muitas atividades a mim incumbidas, pelo conhecimento e experiências compartilhadas, pela parceria e a amizade desde o mestrado. Minha eterna gratidão.

Às queridas amigas e companheiras de trabalho Camila Lopes, Daniella, Daphne e Mariéllen. Agradeço por tê-las em minha vida. Minha gratidão por toda a ajuda nos laboratórios, biotério, nas clínicas, buscando sempre a excelência em nossas atividades e o nosso crescimento profissional. Vocês são o presente que recebi da Unesp para a vida!

À Prof^a Andréa, pela amizade, parceria, por todo conhecimento dividido e pelas oportunidades. Minha gratidão!

Ao Prof Brau pela amizade, pelo conhecimento proporcionado nas clínicas, pelo profissionalismo e dedicação à Odontologia que nos motiva a buscar a excelência na prática da profissão, pelo convívio agradável e alegre que foram importantes para tornar as clínicas da pós-graduação mais leves.

Às queridas funcionárias e amigas Jacqueline, Marcinha e Valéria pelos cafés e conversas, por todo suporte na clínica e no preparo dos materiais nos laboratórios e biotério, sempre com muito carinho. Minha gratidão!

À Profª Assoc. Mônica Fernandes Gomes por toda ajuda, amizade e por abrir as portas do CEBAPE para a realização deste e de muitos outros trabalhos ali realizados.

Ao querido amigo Walter, técnico do laboratório de Histologia, pelos ensinamentos, por toda ajuda e pelos momentos de descontração nas longas jornadas de laboratório.

Aos amigos Thiago Lazzari, Marcelo, Cahe, Letícia Torquato, Tatiane e Victória pela ótima convivência e companheirismo.

Aos amigos dos departamentos de Patologia (Bruna, Gabriela Santana, Gabriela Lima, Pedro e Rodrigo) e Microbiologia (Lucas e Liliana) agradeço pelo convívio nas aulas, nos laboratórios, pelo conhecimento compartilhado e toda amizade.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista – Unesp por mais esta oportunidade de capacitação.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT Unesp e seus funcionários pela agradável jornada durante esses 5 anos nesta casa de ensino.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao pesquisador do INPE Mário Celso Padovan de Almeida pela cooperação na elaboração do equipamento gerador do campo eletromagnético.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx) - USP, na pessoa do Professor Antônio Martins Figueiredo Filho, pelo auxílio na aquisição dos materiais usados na tese.

À Titanium Fix pela colaboração na doação dos implantes.

Aos funcionários do biotério, Sr. Toninho e André, agradeço pelo cuidado com os animais desta pesquisa e por todo o auxílio prestado.

Aos colegas da Periodontia agradeço pelo convívio fraterno.

À Prof^a Assoc. Luana Vasconcelos pelo fornecimento dos materiais da cultura celular e empréstimo dos equipamentos.

"Ore como se tudo dependesse de Deus e trabalhe como se tudo dependesse de
você". Santo Inácio de Loyola

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Delineamento experimental	22
3.2 Cirurgia para inserção dos implantes osseointegrados	24
3.3 Exposição ao Campo Eletromagnético Pulsado (CEMP).....	26
3.4 Eutanásia e processamento histológico	27
3.5 Ensaio mecânico	28
3.6 Confeção das lâminas histológicas	29
3.7 Análises histomorfométricas	31
3.8 Avaliação radiográfica tridimensional (microCT)	32
3.9 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	34
3.9.1 Cultura Celular	35
3.9.2 Avaliação da proliferação celular	37
3.9.3 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)	37
3.9.4 Conteúdo de proteína total	38
3.9.5 Atividade de fosfatase alcalina.....	39
3.9.6 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização	39
4 Análise estatística	41
5 RESULTADO	42
5.1 Análise biomecânica	42
5.2 Análises histomorfométricas	43
5.3 Avaliação radiográfica tridimensional (microCT)	45
5.3.1 Porcentagem de volume ósseo	45
5.3.2 Espessura do osso trabecular.....	46

5.3.3 Número de trabéculas	47
5.3.4 Densidade mineral óssea.....	48
5.4 Avaliação dos ensaios <i>in vitro</i>	49
5.4.1 Avaliação da proliferação celular.....	49
5.4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)	51
5.4.3 Conteúdo de Proteína total.....	51
5.4.4 Atividade da Fosfatase alcalina.....	52
5.4.5 Quantificação dos nódulos de mineralização.....	53
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE	70
ANEXO	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flow chart da randomização dos animais nos grupos experimentais.	23
Figura 2 - Fluxograma do período experimental em suas fases.....	23
Figura 3 – Procedimentos cirúrgicos nos animais.....	25
Figura 4 - Equipamentos construídos para a geração do campo eletromagnético pulsado.....	27
Figura 5 - Representação da realização do torque de remoção.....	29
Figura 6 - Procedimentos laboratoriais para análises histomorfométricas.....	31
Figura 7 - Reconstituição e padronização das imagens escaneadas.....	33
Figura 8 - Determinação das regiões de interesse através do software CTAn....	34
Figura 9 - Procedimentos para a coleta de células mesenquimais.....	36
Figura 10 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do torque de remoção.....	42
Figura 11 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do contato osso-implante (BIC)	43
Figura 12 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da porcentagem de área de fração óssea (BAFO)	44
Figura 13 - Figura representativa das lâminas utilizadas nas análises histomorfométricas nos períodos e grupos experimentais	45

Figura 14 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da porcentagem de volume ósseo (BV/TV)	46
Figura 15 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da espessura do osso trabecular	47
Figura 16 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do número de trabéculas	48
Figura 17 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da densidade mineral óssea	49
Figura 18 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da proliferação celular	50
Figura 19 - Proliferação celular	50
Figura 20 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da viabilidade celular	51
Figura 21 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do conteúdo de proteína total	52
Figura 22 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da atividade da fosfatase alcalina	53
Figura 23 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da formação e quantificação dos nódulos de mineralização.....	54
Figura 24 - Formação de nódulos de mineralização.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase Alcalina
ANOVA	Análise de Variância
ARRIVE	Pesquisa em Animal: Relato de Experimentos <i>In Vivo</i>
BIC	Extensão Linear do Tecido Ósseo em Contato com o Titânio
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea -2
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
CEM	Campo Eletromagnético
CEMP	Campo Eletromagnético Pulsado
Cl ⁻	Cloreto
Col-1	Colágeno tipo 1
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMO	Densidade Mineral Óssea
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
GTA	Grupo Teste A exposto por 3 horas ao CEMP
GTB	Grupo Teste B exposto por 1 hora ao CEMP
Hz	Hertz
K ⁺	Potássio
kV	Quilovolt
LEIC	Laboratório de Ensaio Interdisciplinar de Células
microCT	Microtomografia de Raios X
mL	Mililitro
mT	Militesla
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
Na ⁺	Sódio
Na ₂ CO ₃	Bicarbonato de Sódio
Nm	Nanômetro
OCN	Osteocalcina

Osx	Osterix
PBS	Tampão Fosfato-Salino
ROI	Região de Interesse
Runx2	Fator de Transcrição 2 Relacionado a Runt
Tb.N	Número de Trabéculas
Tb.Th	Espessura Trabecular
μ A	Microampére
Mg	Micrograma
μ L	Microlitro

Moretto-Nunes CM. Avaliação de diferentes protocolos de campo eletromagnético pulsado na osseointegração de implantes [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

A terapia com implantes osseointegrados é uma abordagem clínica eficaz e com altos índices de sucesso dependente do processo de osseointegração. Com a necessidade de uma reabilitação em menor tempo e sucesso em longo prazo, a aplicação do campo eletromagnético (CEMP) na osseointegração tem sido alvo de estudos. Esta é uma terapia não invasiva capaz de promover efetiva formação e quantidade de osso em contato com a superfície do implante em menor tempo, aumento no grau de mineralização e maturação óssea. Essa abordagem também provoca o aumento da adesão inicial, proliferação e diferenciação dos osteoblastos e da expressão gênica associados à osteogênese. Entretanto, nota-se também resultados controversos do uso do CEMP no processo de osseointegração e de cicatrização. Com isso, questiona-se a utilização protocolos que envolvem diferentes parâmetros do campo eletromagnético nos resultados disponíveis, especialmente o tempo de aplicação. Assim, torna-se importante ainda verificar a possibilidade de um protocolo que aborde, a partir de parâmetros fixos do CEMP, durações ideais para a otimização da osseointegração. Para isso, foram utilizados 60 animais (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), randomizados em três grupos experimentais: controle, teste A e teste B. Todos receberam implantes em ambas as tíbias, e a aplicação do CEMP ocorreu apenas nos grupos teste. O período experimental teve duração de 60 dias com 4 períodos de eutanásia. As peças foram separadas e preparadas para o teste mecânico, análises histomorfométricas, microtomografia computadorizada (μ CT) e ensaios biológicos *in vitro*. Os dados foram tabulados e a análise de variância ANOVA foi aplicada, com nível de significância de 5%. Os resultados obtidos revelaram que, o grupo B apresentou melhores resultados em comparação ao grupo A nos testes de torque de remoção em 07 dias; no volume ósseo e densidade mineral óssea, ambos em 07, 21 e 45 dias; na proliferação celular em 21 dias, na viabilidade celular em 07 e 45 dias, no conteúdo de proteína total em 07 dias e nódulos de mineralização em 03 e 07 dias. O grupo A apresentou melhor desempenho na avaliação da espessura do osso trabecular em 03 dias e na proliferação celular em 03 e 45 dias comparado ao grupo B. Os grupos teste apresentaram resultados superiores ao controle nas avaliações de contato osso-implante, espessura do osso trabecular, na viabilidade celular, conteúdo de proteína total e fosfatase alcalina. Na análise histomorfométrica e no número de trabéculas não houve diferenças entre os grupos teste. Considerando as limitações do presente estudo, a aplicação do campo eletromagnético pulsado como um bioestimulador foi efetivo na otimização dos eventos no tecido ósseo que acarretam na osseointegração, especialmente quando aplicado por menor tempo e nos períodos iniciais da cicatrização óssea.

Palavras-chave: Osseointegração. Campos Eletromagnéticos. Implantes Osteointegrados. Ratos.

Moretto-Nunes CM. Evaluation of different protocols of pulsed electromagnetic fields in implants osseointegration: in vivo and in vitro study [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

The dental implants therapy is an effective clinical approach and high success rates dependent on the osseointegration process. The necessity of rehabilitation in short time and long-term success, the electromagnetic field (PEMF) application on osseointegration has been the subject of studies. This is a noninvasive therapy capable of promoting effective formation and quantity of bone in contact with the implant surface in a shorter time, increased mineralization degree and bone maturation. This approach also promotes increased initial osteoblasts adhesion, proliferation and differentiation and gene expression associated with osteogenesis. However, there are also controversial results from the use of CEMP in the osseointegration and healing process. Thus, the use of protocols that involve different electromagnetic field parameters in the available results is questioned, especially the application time. Thereby is important it becomes even verify the possibility of a protocol to use to guide an optimal durations for osseointegration. For this, 60 animals will be used (*Rattus norvegicus*, albinus variation, Wistar) were randomized into three groups, with and without application of PEMF with implants placed in both tibias. The trial period will last 67 days and 4 euthanasia periods. The pieces were separated and prepared for mechanical testing, histomorphometric analysis, computed microtomography (μ CT) and in vitro biological assays. Data were tabulated and analysis of variance ANOVA was applied, with significance level of 5%. The results showed that group B presented better results compared to group A in the removal torque tests at 07 days; in bone volume and bone mineral density, both at 07, 21 and 45 days; cell proliferation at 21 days, cell viability at 07 and 45 days, total protein content at 07 days and mineralization nodules at 03 and 07 days. Group A had better performance in assessing trabecular bone thickness at 03 days and cell proliferation at 03 and 45 days compared to group B. Test groups showed better results than control in bone-implant contact assessments, trabecular bone thickness, cell viability, total protein content and alkaline phosphatase. In the histomorphometric analysis and the number of trabeculae there were no differences between the test groups. Considering the limitations of the present study, the application of the pulsed electromagnetic field as a biostimulatory was effective in optimizing the osseointegration events in the bone tissue, especially when applied for a shorter time and in the initial periods of bone healing.

Keywords: Osseointegration. Electromagnetic Fields. Bone-Anchored Implants. Rats.

1 INTRODUÇÃO

A abordagem clínica com implantes osseointegrados para substituição parcial ou total de elementos dentais é uma técnica bem documentada e cientificamente aceita, com elevados índices de sucesso. Inicialmente, a instalação de implantes dentários tinha como objetivo reestabelecer a função mastigatória, entretanto, além dessa função, atualmente pretende-se melhorar a estética, com reduzido tempo de tratamento e sucesso em longo prazo (Matsumoto et al., 2000).

A osseointegração é um dos principais fatores responsáveis pelo êxito da terapia com implantes osseointegrados. Esse termo, inicialmente introduzido por Branemark, descreve o complexo fenômeno do contato histológico direto entre osso-implante, sendo esse capaz de receber cargas funcionais sem que haja movimento relativo progressivo entre eles (Branemark et al., 1977; Branemark P-I, 1983; Dimitrou, Babis, 2007; Fadly et al., 2014; Kim et al., 2017).

A cicatrização óssea ao redor do implante é um processo complexo que envolve diversos eventos celulares e moleculares que promovem a ativação das sequências osteogênica, vascular e imunológica que compõem as fases da osseointegração (inflamação, vascularização, formação e remodelação óssea) (Balbino et al., 2005; Mendonça, Coutinho-Netto, 2009; Gürgen et al., 2014).

A literatura mostra que, tanto em estudos em humanos quanto estudos em animais, a cicatrização óssea é um processo lento podendo durar um período de 2 a 6 meses entre a instalação do implante e reabilitação funcional do paciente (Dimitrou, Babis, 2007; Nascimento et al., 2012; Leesungbok et al., 2013; Barak et al., 2016).

As pesquisas recentes buscam metodologias que possam otimizar a osseointegração de implantes e, dentre elas, os fatores relacionados ao implante como design, composição química, topografia e caracterização de superfície (Ajami et al., 2016), as características do leito receptor que envolvem a vascularização e celularização do leito (Dergin et al., 2013), a estabilidade mecânica (estabilidade primária do implante) e terapias adjuvantes com enxerto ósseo autógeno ou aloenxerto, tratamento com proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e estimulação biofísica (Aaron, Ciombor, 1993; Lirani, Lazaretti-Castro, 2005; Kim et al., 2017) tem

sido estudados (Matsumoto et al., 2000; Dimitrou, Babis, 2007; Leesungbok et al., 2013; Fadly et al., 2014; Barak et al., 2016).

A estimulação biofísica do tecido ósseo através das modalidades terapêuticas: estimulação elétrica, campo eletromagnético pulsado (CEMP) e vibração mecânica, há décadas é testada para promover cicatrização de fraturas, reparo de feridas e de diferenciação tecidual na interface osso-implante (Fini et al., 2002; Akca et al., 2007; Leesungbok et al., 2013; Massari et al., 2019). Estudos mostraram sua capacidade em regular a expressão dos genes de proteínas estruturais da matriz extracelular, resultando em aceleração do reparo ósseo (Aaron et al., 2004), principalmente pelo campo eletromagnético pulsado (Noriega-Luna et al., 2011; Wang et al., 2014; Jing et al., 2016; Galli et al., 2018).

O mecanismo de ação pelo qual a estimulação através dos campos eletromagnéticos pulsados exerce esses efeitos no tecido ósseo pode ser explicado na fisiologia celular. Nos processos celulares observa-se que existem pequenas correntes elétricas produzidas a partir das funções normais das reações do organismo que geram partículas eletricamente carregadas (Ferroni et al., 2016; Galli et al., 2018). Além disso, as membranas celulares apresentam um potencial elétrico (potencial de membrana) que separa as cargas elétricas geradas pelos solutos, como sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) que estão em maiores concentrações no meio extracelular, e potássio (K^+) e moléculas orgânicas que prevalecem em maior quantidade no meio intracelular (Ross et al., 2015). As alterações nos potenciais de membrana podem ser provocadas por mudanças nos movimentos iônicos através da membrana celular gerando campos eletromagnéticos endógenos. Esses campos endógenos resultam por exemplo, do movimento de músculos, tendões e ações do sistema músculo-esquelético (Ross et al., 2015; Hastings, Mahmud, 1988). O tecido ósseo, dentre suas características, tem a capacidade de converter cargas mecânicas em sinais bioelétricos, ou seja, apresenta piezoelectricidade. Esse fenômeno tem sido sugerido como responsável no controle do reparo e remodelação óssea através da movimentação do fluido extracelular que transporta íons na matriz óssea (Yoshida et al., 2009; Ross et al., 2015; Galli et al., 2018). Com a aplicação exógena de CEMP os mecanismos intra e extracelulares são ativados evidenciando a sua capacidade de permear no plasma e nas membranas celulares (Ross et al., 2015; Massari et al., 2019). De acordo com Funk, Monsees, 2006, os campos

eletromagnéticos (CEM) atingem profundamente as camadas de tecido vivo, atuando diretamente nas organelas celulares (Ross et al., 2015) e influenciando reações químicas e bioquímicas nas células (Daish et al., 2018; Funk, 2018). Ao pulsar o CEM provoca-se o aumento e redução nos fluxos iônicos gerando corrente elétrica (Leesungbok et al., 2013; Kim et al., 2017) e o potencial de membrana é alterado tornando-a permeável, especialmente para o íon cálcio (Ca^{2+}), um importante sinalizador intracelular (Parekh, 2011; Tong et al., 2017; Selvamurugan et al., 2018) na indução da diferenciação celular em osteoblastos (Ross et al., 2015; He et al., 2018; Tong et al., 2017; Galli et al., 2018; Naito et al., 2019). Desta forma, o CEMP afeta as correntes moleculares e causam uma sinalização transmembrana específica que promove a diferenciação osteogênica (Jazayeri et al., 2017, Tong et al., 2017; Suryani et al., 2019) a partir da estimulação da síntese de proteínas da matriz extracelular óssea (Ehnert et al., 2015, Selvamurugan et al., 2018). Com isso, o tecido ósseo se torna um alvo favorável para o tratamento com CEMP (Galli et al., 2018).

A aplicação adjunta do CEMP no tecido ósseo com implante osseointegrado é uma terapia não invasiva e que, em estudos *in vivo*, mostrou-se efetiva na formação de osso em contato com a superfície do implante (Matsumoto et al., 2000, Akca et al., 2007), na osseointegração com aumento no grau de mineralização e maturação óssea (Grana et al., 2008; Jing et al., 2016), e aumento da fixação mecânica (Fini et al., 2002).

Também foi observado um aumento na quantidade de osso formado em menor tempo ao redor de implantes colocados imediatamente após a extração dental (Shayesteh et al., 2007), que pode ser comprovado pelo pico de porcentagem de osso em contato com o implante formado em duas semanas, ou seja, uma redução do tempo três vezes maior (Barak et al., 2016).

Os efeitos biológicos observados com aplicação do CEMP em estudos *in vitro* revelaram um aumento na adsorção de proteínas à superfície dos implantes, facilitando a adesão inicial dos osteoblastos (Noriega-Luna et al., 2011; Wang et al., 2014; Jing et al., 2016). Foi observado também o aumento na proliferação e diferenciação dos osteoblastos, e formação de nódulos de mineralização por essas células (Wang et al., 2014; He et al., 2018). Em relação à expressão de genes associados com a osteogênese, observou-se que Col-1, Runx2 e Osx (Jing et al.,

2016), ALP, BMP-2, OCN (Jansen et al., 2010; Wang et al., 2014) foram mais expressos com a aplicação de CEMP em relação ao controle.

Embora sejam observados benefícios obtidos com a aplicação do CEMP no tecido ósseo, a literatura também revela que essa terapia não resultou em melhora significativa do processo de osseointegração (Buzzá et al., 2003) e também da cicatrização óssea (Nascimento et al., 2012) entre os grupos tratados e controle *in vivo*, uma vez que, o campo eletromagnético não afeta o *turnover* ósseo nas trabéculas ósseas pré-existentes (Barak et al., 2016).

Nos estudos *in vitro*, o tempo de exposição de culturas de osteoblastos ao CEMP não resultou em efeito no número de células, síntese proteica e estrutura nuclear (Noriega-Luna et al., 2011) e diferenciação dos osteoblastos (Chang et al., 2004).

Os autores questionam a variabilidade de protocolos de tratamento do CEMP nos resultados *in vitro* e *in vivo* na osseointegração dos estudos disponíveis na literatura, especialmente em relação à duração de sua aplicação no tecido ósseo (Matsumoto et al., 2000; Lirani, Lazaretti-Castro, 2005; Akca et al., 2007; Dimitrou, Babis, 2007; Nascimento et al., 2012; Daish et al., 2018). Dessa maneira, torna-se necessário estabelecer um protocolo padrão de utilização do CEMP que aborde parâmetros ideais para sua utilização na Odontologia, principalmente na otimização do processo da osseointegração de implantes.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes tempos de aplicação do campo eletromagnético pulsado padronizado em tíbias de ratos para verificar e estabelecer o que melhor exerce efeito na osseointegração.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar a partir do torque de remoção a integração do implante de titânio ao osso da tíbia após a aplicação do campo eletromagnético pulsado. Analisar através da histomorfometria a porcentagem de contato entre osso e implante (BIC) e área de fração óssea entre as espiras do implante (BAFO). Com a microtomografia computadorizada (μ CT) avaliar a quantificação da extensão linear osso-implante (porcentagem do volume ósseo neoformado, espessura do osso trabecular e número de trabéculas e densidade mineral óssea). E a realização dos ensaios biológicos *in vitro* para verificar o efeito da aplicação do campo eletromagnético pulsado na proliferação e viabilidade celular, na atividade da fosfatase alcalina e no conteúdo de proteína total, e na formação dos nódulos de mineralização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

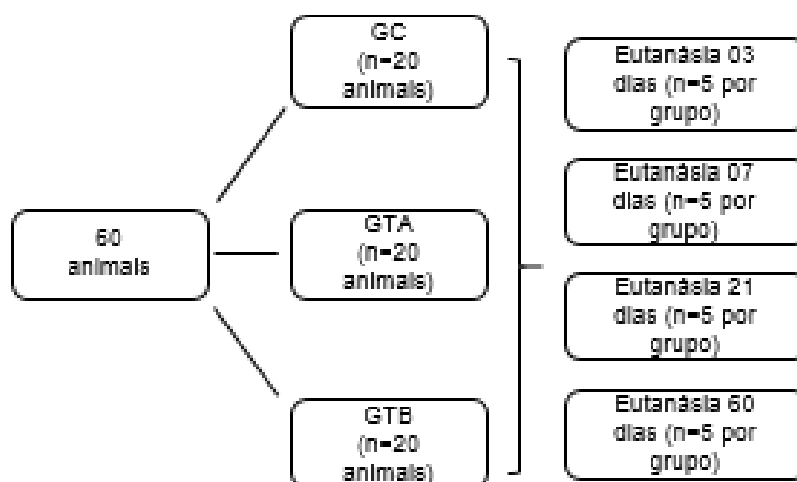
A amostra foi constituída por 60 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com noventa dias de idade, pesando em torno de 250 a 300 gramas. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 animais por gaiola, e mantidos em temperatura ambiente, alimentados com ração GuabiNutrilabor® e água *ad libitum*, fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, Curso de Odontologia e com a aprovação da Comissão de Ética em Experimentos com Animais do ICT – UNESP (nº17/2016). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo ARRIVE “*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*”.

3.1 Delineamento experimental

Os animais foram randomizados em 3 grupos experimentais, segundo uma tabela gerada em computador, em: grupo controle GC (n=20), grupo teste A (GTA, n=20) com exposição ao CEMP por 3 horas, e grupo teste B (GTB, n=20) com exposição ao CEMP por 1 hora. Todos os grupos apresentaram quatro subgrupos referentes aos períodos de eutanásia (Figura 1).

Todos os animais dos 3 grupos receberam 3 implantes de titânio nas tíbias (2 na tíbia direita e 1 na tíbia esquerda).

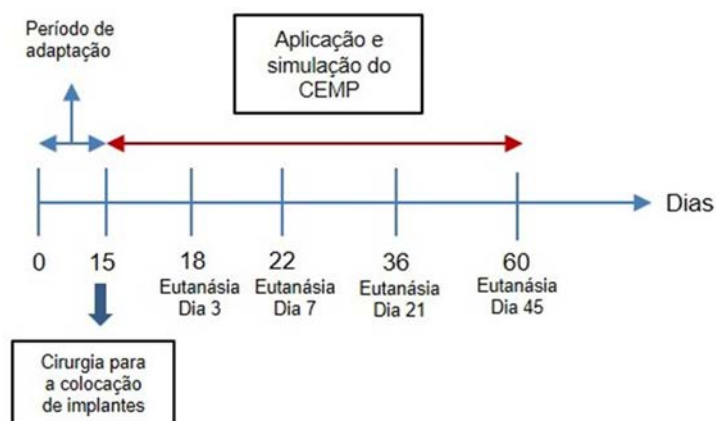
Figura 1 - Flow chart da randomização dos animais nos grupos experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor.

O experimento teve duração de 60 dias divididos em 5 períodos de intervenção nos quais os procedimentos foram realizados (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma do período experimental em suas fases



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o período de adaptação de 15 dias ao biotério os animais de cada grupo foram submetidos às cirurgias para a instalação de implantes osseointegráveis. Conforme os procedimentos cirúrgicos foram iniciados nos grupos, os animais operados foram expostos ao CEMP (n=5 animais por vez), de acordo

com o grupo experimental (GTA e GTB) até a realização da eutanásia que consistiu em períodos curtos (subgrupos 3 e 7 dias), médio (subgrupos 21 dias) e longo (subgrupos 45 dias). Esses períodos experimentais são justificados pelo fato do presente trabalho propor avaliar o efeito da aplicação do campo eletromagnético nas fases iniciais e tardias da osseointegração, tanto no âmbito celular quanto estrutural do tecido ósseo, através dos parâmetros (ensaio mecânico de torque, análises histomorfométricas, microtomografia computadorizada e ensaios em cultura celular) (Matsumoto et al., 2000; Mendonça et al., 2009; Mendonça et al., 2010; Omar et al., 2011).

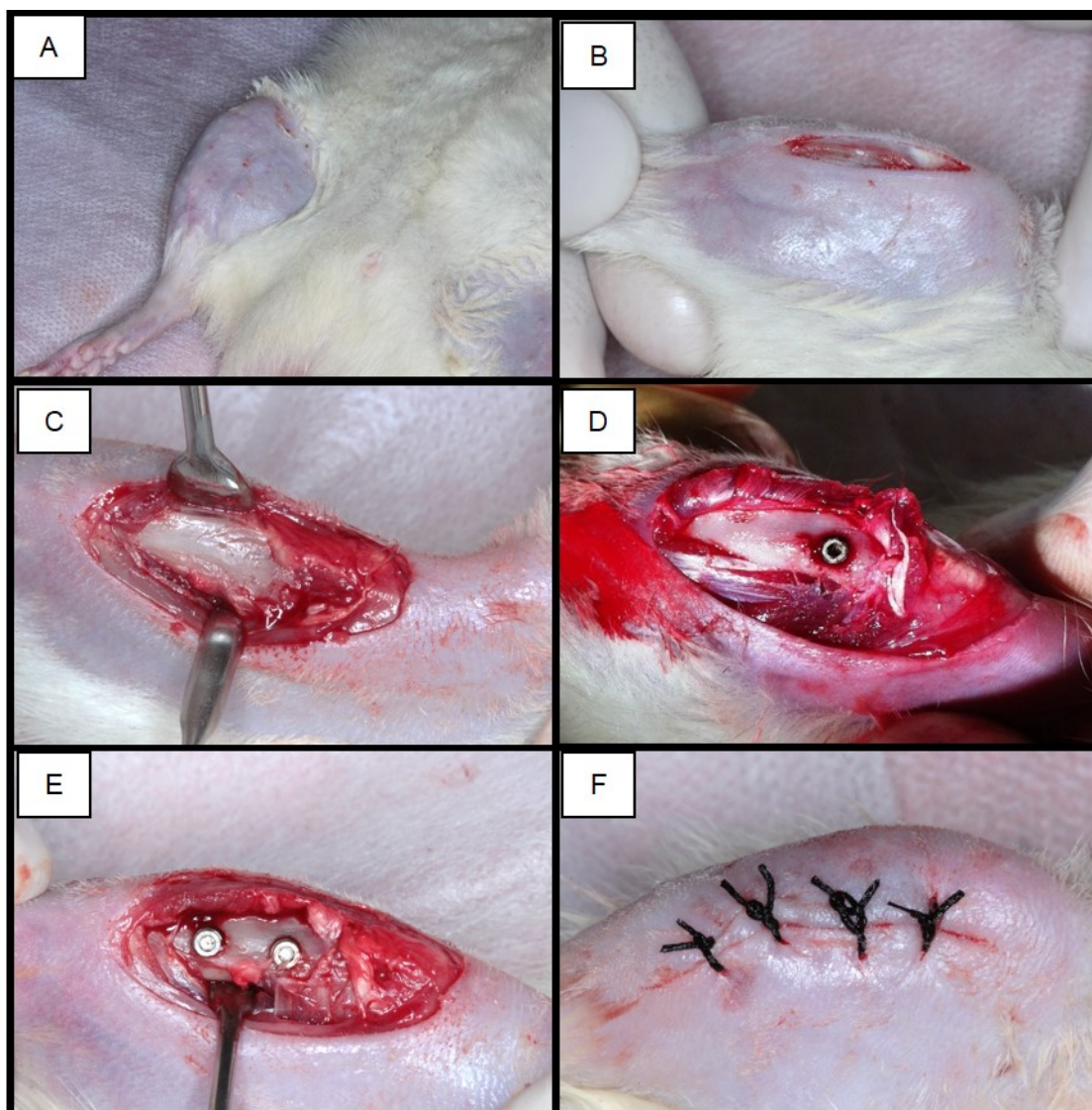
3.2 Cirurgia para inserção dos implantes osseointegrados

Para o procedimento cirúrgico foi realizado o protocolo de anestesia com a aplicação de solução de 13 mg/Kg de cloridrato de 2- (2,6-xilidino) -5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum - Bayer[®] do Brasil), associado ao relaxante muscular 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands[®] do Brasil), anestésico geral, via intramuscular.

Em seguida, a tricotomia da região interna das patas direita e esquerda foram realizadas com lâminas de barbear (Wilkinson Sword[®], Energizer Canada Inc., Schick Division, Walkerton, ON, Canadá) e, em seguida, a desinfecção da região foi realizada com digluconato de clorexidina a 0,2%.

O protocolo utilizado para este procedimento cirúrgico de instalação do implante foi baseado no estudo de Molon et al. (2013) que consistiu em uma incisão, com auxílio da lâmina de bisturi, de 2 cm na região interna da porção posterior da pata, logo abaixo do joelho, para a exposição da metáfise da tíbia. Em seguida, foram realizadas a divulsão do tecido muscular e a osteotomia com auxílio de brocas e irrigação com solução salina estéril para a confecção da área na qual os implantes foram inseridos (Figura 3).

Figura 3 - Procedimentos cirúrgicos nos animais



Legenda: a) incisão; b) vista da incisão completa; c) divulsão do tecido muscular; d) exposição do tecido ósseo; e) perfuração do tecido ósseo; f) implante de titânio inserido.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na pesquisa foram necessários 180 implantes de titânio puro, de superfície usinada, osseointegráveis, rosqueáveis, com 4,0 mm de comprimento por 2,2 mm de diâmetro (Titanium Fix[®], AS Technology Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) inseridos em ambas as patas de cada animal dos grupos experimentais.

Na pata direita, o primeiro implante foi inserido a 7 mm de distância da junção do joelho e o segundo posicionado a 5 mm distal do primeiro. Na pata esquerda um implante foi inserido a 7 mm da junção do joelho, até que todas as

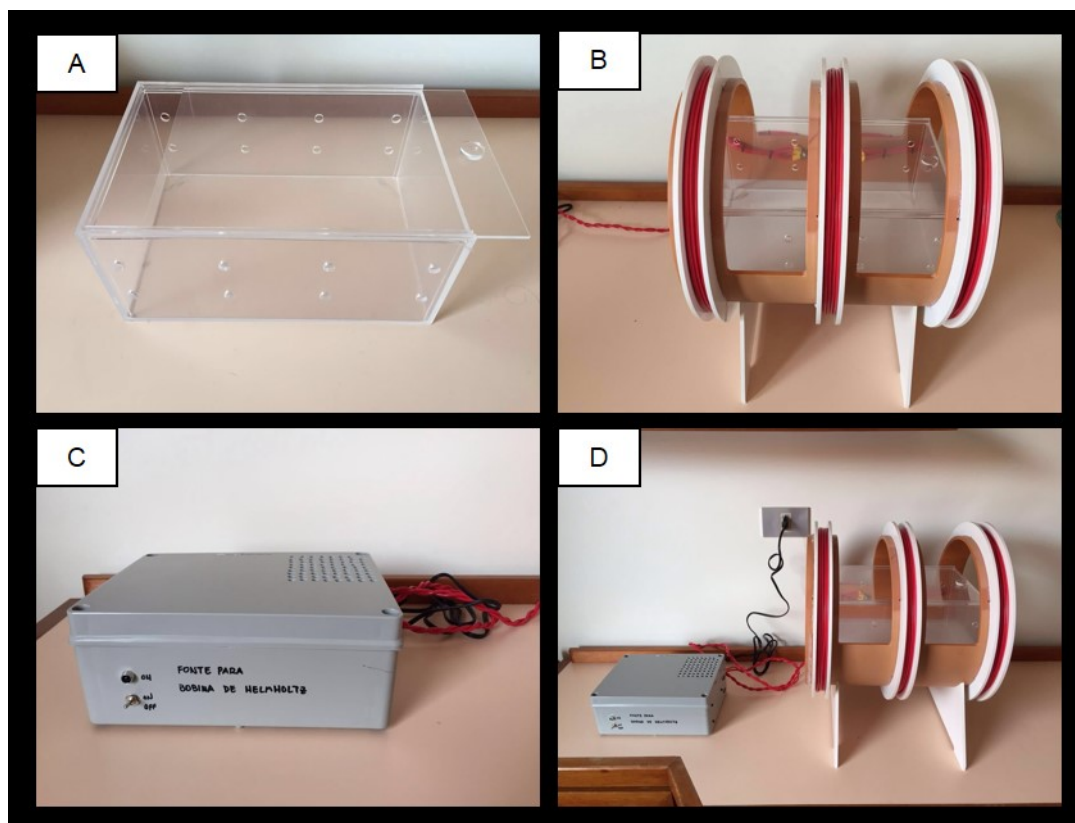
roscas do parafuso se encontrasse no interior do osso cortical. O tecido muscular que foi divulsionado para a exposição da tíbia foi suturado com fios de sutura reabsorvíveis (Vicryl Ethicon[®] 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) e a pele com fio de seda 4.0 (Ethicon[®] Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil).

Os animais por fim receberam imediatamente após a cirurgia uma dose única de Ketoprofen, 10mg/kg por via subcutânea para o controle de dor pós-operatória.

3.3 Exposição ao Campo Eletromagnético Pulsado (CEMP)

O dispositivo de exposição do CEMP foi composto por um gerador de sinal pulsátil e as bobinas de Helmholtz. 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 repetiu à taxa de 15 Hz (Figura 4). O tempo de duração da exposição ao CEMP no grupo teste A foi de 3 horas por 5 dias da semana (Midura et al., 2005; Androjna et al., 2014), enquanto que, para o grupo teste B foi de 1 hora por dia, por 5 dias da semana, até a eutanásia dos subgrupos (McLeod, Rubin, 1992).

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: Elaborado pelo autor.

A gaiola contendo os 5 animais de cada subgrupo por vez foi posicionada bem no centro do campo gerado pelas bobinas de Helmholtz. Os animais dos subgrupos controle também foram colocados na gaiola entre o conjunto de bobinas, porém sem ativação do CEMP, pois o intuito foi simular a estimulação e o estresse aos quais os demais animais foram submetidos (Tucker et al 2016).

3.4 Eutanásia e processamento histológico

De acordo com cada período experimental dos grupos foi realizada a

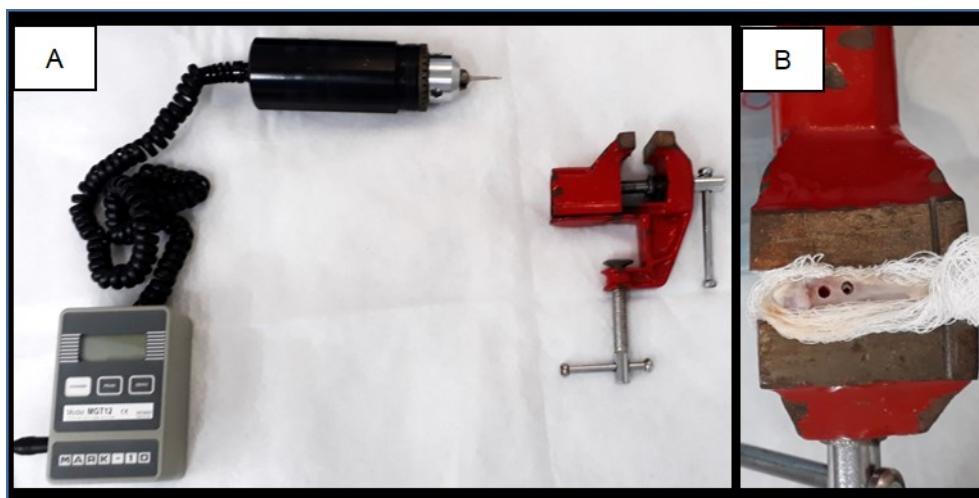
eutanásia com solução anestésica em alta dosagem e, em seguida, as tíbias das patas esquerdas de todos os animais foram removidas e armazenadas para a fixação em solução de formaldeído a 10% tamponado, por 48 horas. Após esse período, foram conservadas em álcool 70% em até o momento da análise radiográfica tridimensional (microCT) e em seguida, foram tratadas para a confecção das lâminas histológicas, e posterior análise histomorfométrica. As tíbias das patas direitas foram removidas, dissecadas e armazenadas em solução de ringer lactato, em freezer de -80°C até que fossem realizadas as mensurações do torque de remoção dos implantes.

3.5 Ensaio mecânico

As tíbias das patas direitas foram descongeladas em temperatura ambiente para a mensuração dos torques de remoção dos implantes dos grupos experimentais.

Para isso, uma morsa foi utilizada para a estabilização do osso e, através de um torquímetro digital (MGT 12; Mark-10 Corp[®]., Copiague, NY, Estados Unidos) foi aplicado um contra-torque no implante até houvesse seu movimento. Os dados foram registrados e tabulados para a análise estatística (Figura 5).

Figura 5 - Representação da realização do torque de remoção



Legenda: Na imagem A está representado o conjunto formado pelo torquímetro digital e a morsa para fixação da tíbia e mensuração do torque de remoção. Em B tem-se a tíbia direita fixada na morsa e o primeiro implante removido.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Confeção das lâminas histológicas

Após o procedimento da microtomografia computadorizada, as peças foram lavadas em água corrente por aproximadamente 30 minutos, desidratadas em concentrações diferentes de álcool (Álcool 80%; Álcool 90%; Álcool absoluto). Em seguida, as peças foram imersas no xilol 98% durante 24 horas e, em seguida, em um novo xilol por mais 48 horas. As peças foram então transferidas para a solução A (85mL de metilmetacrilato (Sigma Aldrich[®], Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) + 15mL de dibutilftalato (Sigma Aldrich[®], Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) por 4 dias, e depois para a solução B (solução A + 1g de peróxido de benzoíla (VETEC química, Rio de Janeiro, Brasil) e mantidas em geladeira por 4 dias. Para a inclusão, foi feita uma nova solução A acrescida de 3g de peróxido de benzoíla e, em pequenos vidros âmbar (6x4 mm), foi colocada uma pré-base desta mistura. Em seguida, as peças foram coladas nesta pré-base com cola instantânea (Super Bonder[®], Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil) e a solução foi vertida sobre o conjunto, dentro do vidro, até que ultrapassasse 1 cm da peça. O vidro foi então

tampado (figura 3-A) e colocado na estufa (37°C) até que a solução tomasse presa. Em seguida, procedeu-se a quebra do vidro e o bloco obtido foi cortado no aparelho Labcut (Labcut[®] 1010 – Extec, Erios, Enfield, Connecticut, Estados Unidos) com disco de corte diamantado (Buehler[®] IsoMet[®] Chicago, Illinois, Estados Unidos). O polimento dos cortes foi realizado com uma suspensão de polimento (Extec[®] colloidal sílica- Erios, Enfield, Connecticut, Estados Unidos) do lado do corte que foi colado nas lâminas, com um disco de feltro na politriz (Labpol[®] 8-12 Extec, Erios, Enfield, Connecticut, Estados Unidos), para então serem colados em lâminas histológicas de plaxiglass com cola instantânea de cianoacrilato (Super Bonder[®], Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brasil), e prensados com uma prensa manual. Em seguida, os cortes foram desgastados em uma politriz (Labpol[®] 8-12 Extec, Erios, Enfield, Connecticut, Estados Unidos), usando lixas d'água (800 a 1200), até que uma espessura de aproximadamente 0,25 mm fosse obtida sendo suficiente para visualização de estruturas em microscópio de luz. As lâminas foram então novamente polidas e coradas com azul de toluidina 2%, armazenadas em estufa 37°C por 20 minutos e lavadas em água corrente. Com as lâminas histológicas preparadas foram capturadas as imagens histológicas para posteriores análises histomorfométricas (Figura 6).

Figura 6 – Procedimentos laboratoriais para análises histomorfométricas



Legenda: a) soluções de dibutil e metil metacrilato e peróxido de benzoíla; b) frascos com as tíbias esquerdas inseridas na resina; c) amostra após a quebra do frasco; d) posicionamento da amostra no equipamento; e) conjunto pronto para o corte; f) corte histológico corado com azul de toluidina.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7 Análises histomorfométricas

As variáveis histomorfométricas analisadas para avaliar a osseointegração estão descritas a seguir.

A extensão linear do tecido ósseo em contato com o titânio (BIC) entre as espiras do implante nas regiões mesial e distal da tíbia foi analisada, e realizada a porcentagem de BIC através do cálculo da extensão linear das espiras analisadas pela extensão linear de contato osso-implante nos diferentes grupos experimentais (de Molon et al., 2013). Para o cálculo da fração de área óssea ocupada (BAFO), foi obtida previamente a área total das espiras avaliadas e a área ocupada por um espaço ou ausência óssea, e depois, foi determinada a porcentagem da área total de espiras ocupadas por tecido ósseo. Para a padronização das medidas, foram selecionadas duas regiões mais centrais através do aumento de 100x na microscopia, permitindo uma melhor visualização da região de interesse, e

calibração de 1840 pixels/ μm . Foram realizadas duas capturas da imagem da lâmina (lado direito e lado esquerdo do implante) para a medição das variáveis histomorfométricas. Com a média dos valores obtidos das medidas foi realizada a análise estatística.

As imagens obtidas através da análise microscópica foram feitas pela captura de imagens das lâminas a partir de um microscópio de luz Axiophot[®] 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc[®] 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) e transmissão para o programa computacional AxioVision[®] Release 4.7.2. As imagens foram codificadas por outro examinador, cego em relação aos grupos, para que uma análise imparcial dos dados fosse realizada.

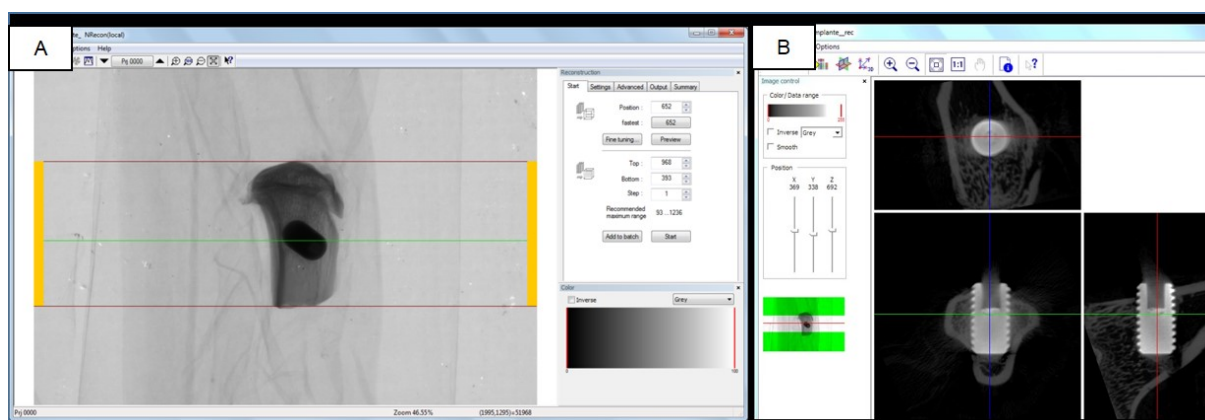
A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa computacional NIH Image J 1.34 (National Institutes of Health, Bethesda, Estados Unidos), de domínio público e os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística.

3.8 Avaliação radiográfica tridimensional (microCT)

As tíbias esquerdas foram submetidas à análise por microtomografia computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan[®] (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica) utilizando cortes de 18 μm de espessura (89 kV e 275 μA), com rotação das peças e filtro de cobre e alumínio de 0.1 mm, com objetivo de reduzir os artefatos gerados pelo titânio. As imagens obtidas foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon[®] (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica) (Figura 7 A). Com o software Data Viewer[®] software (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium) as imagens foram reconstruídas e padronizadas as amostras em posição longitudinal, que se mostrou mais adequada para a avaliação (Figura 7 B). Em seguida, com o software CTAnalyser – CTAn[®] (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica) foi definida uma área ao redor do implante delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante, denominada como Área Total. A partir do *threshold* utilizado nas análises

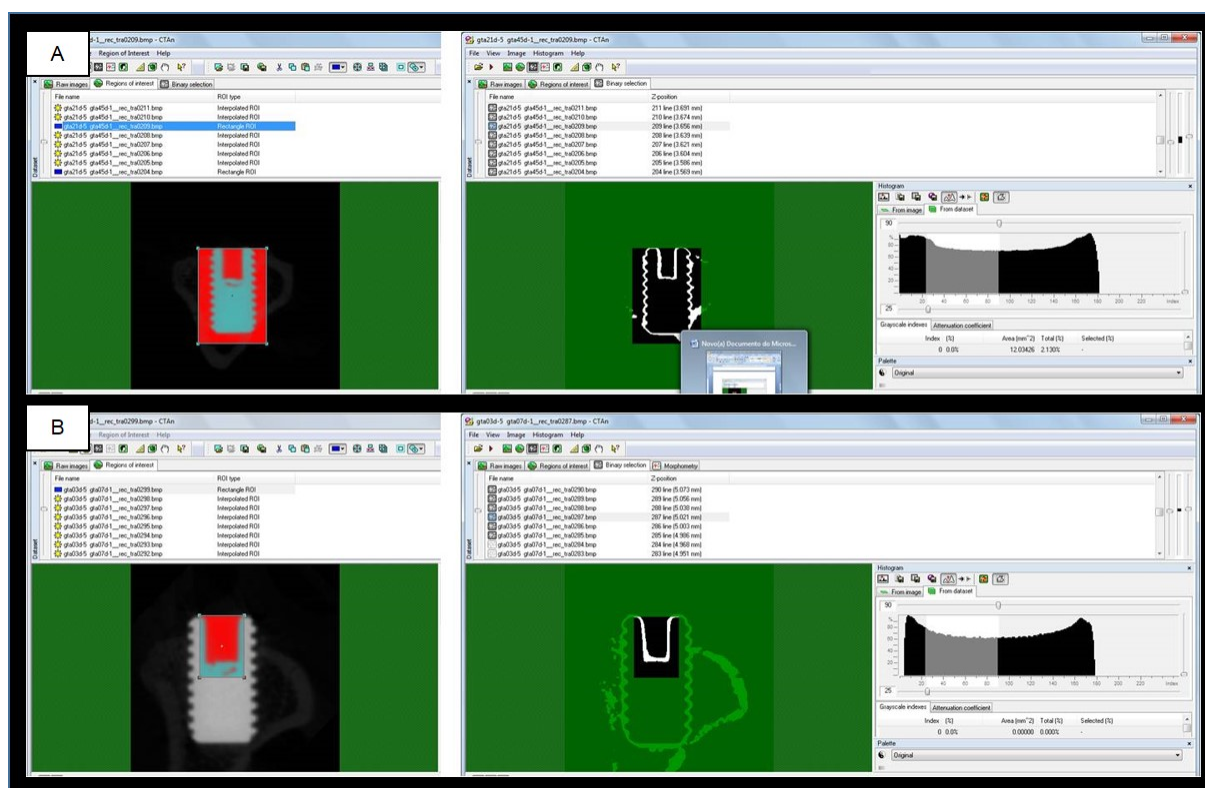
(25-90 tons de cinza) (Scardueli, 2014; Ferro-Alves, 2016) as imagens foram obtidas e foi verificada a similaridade com o tecido ósseo e a imagem inicial, possibilitando obter o volume de osso formado ao redor dos implantes. Uma segunda análise da mesma imagem foi necessária, pois os implantes não receberam o vedante (*cover screw*) e, em alguns casos, houve a formação do tecido ósseo dentro da plataforma protética. Dessa forma, foi definido um segundo ROI que compreendeu a região da plataforma protética (Área da Plataforma). Com os resultados obtidos nos dois ROIs, foi possível definir a área de formação óssea utilizando a fórmula: Área Total – Área Plataforma = Área de formação óssea (Figura 8 A e B).

Figura 7 - Reconstituição e padronização das imagens escaneadas



Legenda: Em A – NRecon, e em B, DataViewer.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 - Determinação das regiões de interesse através do software CTAn



Legenda: Em A – Área total , e em B, Área da plataforma.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com essas ferramentas foi possível analisar a porcentagem de volume ósseo, a espessura do osso trabecular, o número de trabéculas ósseas e a densidade do tecido ósseo (Bouxsein et al., 2010).

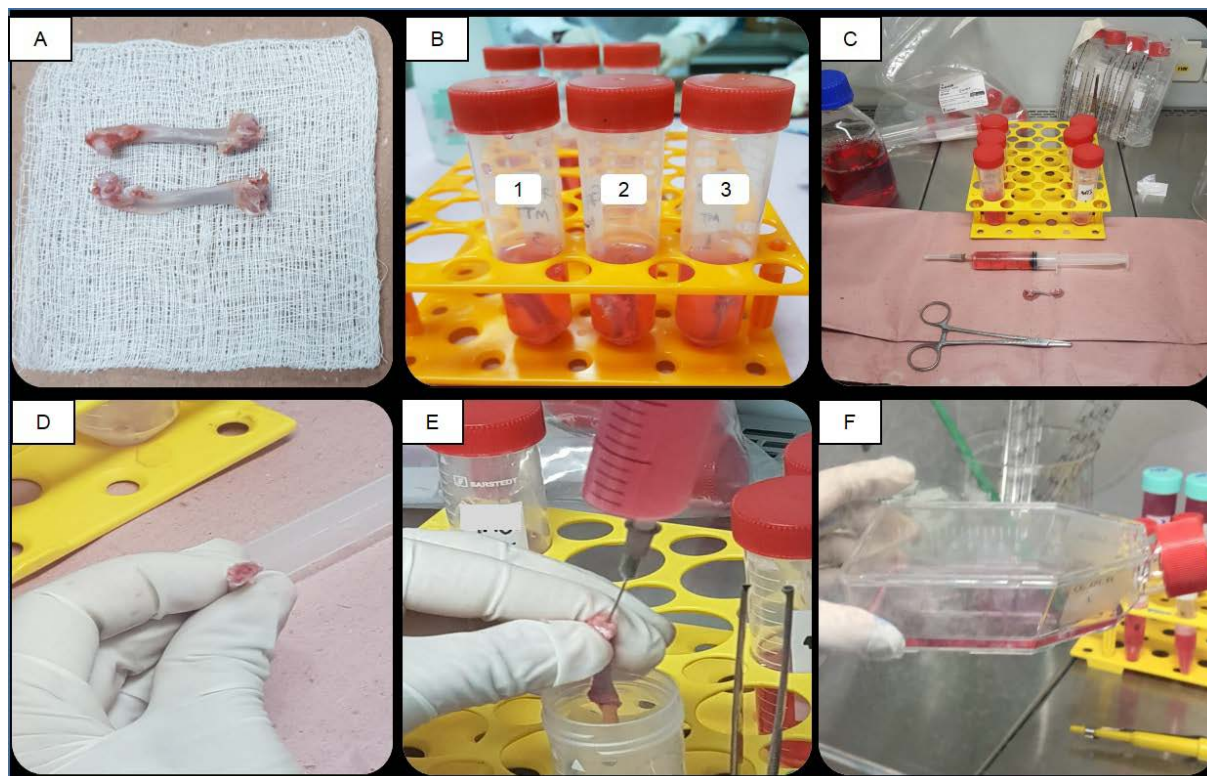
3.9 Ensaios biológicos *in vitro*

Todos os procedimentos biológicos *in vitro* foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC), localizado no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Campus de São José dos Campos.

3.9.1 Cultura Celular

As células da medula óssea dos fêmures de ambas as patas dos animais foram separadas de acordo com os grupos experimentais, isoladas e inseridas em frascos para cultura celular de 250 mL e 75 cm² (TPP, Biosystems, Curitiba, PR, Brasil) com meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco® - Life Technologies, Baltimore, Estados Unidos) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) e gentamicina (500 µg/mL) (Gibco® - Life Technologies, Baltimore, Estados Unidos), e posteriormente foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂. As células mesenquimais foram selecionadas pela aderência ao poliestireno e expandidas até que as células atingissem a confluência, caracterizada pela ocupação de mais de 80% do frasco, para o posterior plaqueamento celular (Figura 9).

Figura 9 – Procedimentos para a coleta de células mesenquimais



Legenda: a) fêmures dissecados; b) fêmures nos frascos com meio de cultura e antibiótico; c) materiais prontos para a coleta de células; d) remoção das epífises; e) remoção das células mesenquimais; f) solução contendo as células na garrafa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para estes procedimentos, inicialmente o meio do frasco de cultura foi aspirado com auxílio de pipeta sorológica e descartado. As células foram lavadas com PBS e foi adicionado ao frasco 3 mL da solução de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), para que as células se desprendessem do fundo do frasco. Em seguida, o conteúdo de tripsina foi neutralizado com 6 mL de meio alfa MEM e o conjunto foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL (TTP, Biosystems, Curitiba, Brasil) que foi centrifugado em 5000 rpm por 5 minutos a 25 °C (Centrífuga Labnet-HERMLE Z 300K, NJ, Estados Unidos), com consequente formação do pellet. O sobrenadante foi desprezado e as células foram re-suspendidas em meio alfa MEM e distribuídas nos poços das placas de 24 poços. Foi realizado o plaqueamento celular com aproximadamente 20.000 células/poço, sendo que as células foram contadas por meio do contador automático Countess[®] (Invitrogen[®], Baltimore,

Estados Unidos). O meio de cultura da placa foi osteogênico, contendo 5mg/mL de ácido ascórbico (Neon[®], Neon Comercial, Suzano, SP, Brasil) e 2,16g de beta glicerofosfato (Sigma-Aldrich[®] ref 50020, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), e foi trocado a cada dois dias. O desenvolvimento das células foi avaliado por microscopia de fase invertida (Carl Zeiss[®] Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Alemanha).

3.9.2 Avaliação da proliferação celular

Para a avaliação da capacidade de proliferação celular, as células-tronco mesenquimais foram cultivadas nos poços das placas (n=5 para cada grupo experimental) por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi aspirado e as amostras lavadas com PBS (Gibco[®] - Life Technologies, Baltimore, Estados Unidos) e fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 minutos. As amostras foram novamente lavadas com PBS, e foi adicionado o corante DAPI (Fluorshield with DAPI – Sigma Aldrich[®]) que permaneceu incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram capturados aleatoriamente 10 campos de cada grupo utilizando o microscópio Axio HBO 100 (Carl Zeiss[®] Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Alemanha) com aumento de 20 vezes e os núcleos presentes sobre as amostras foram quantificados utilizando o software Image J versão 6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

3.9.3 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Após 7 dias de cultura celular foi realizada a avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico pela incubação com o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)carboximetil] (Sigma Aldrich[®], Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e análise espectrofotométrica do corante incorporado. Alíquotas de MTT a 0,5 mg/mL em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das

culturas primárias com esta solução por 4 horas a 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. Após esse período, a solução de MTT foi removida e foi adicionado 500 µL da solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide Gibco® - Life Technologies, Baltimore, Estados Unidos) que permaneceu nos poços por 10 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Em seguida a placa foi colocada sob agitação por 10 minutos para solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 100µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner CELLSTAR®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek® EL808IU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos). Os dados foram aferidos como absorbância e armazenados para análise estatística.

3.9.4 Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi calculado após 10 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37°C, e preenchidos com 2 mL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), para extração das proteínas. Após 30 minutos, 1 mL da solução de cada poço foi misturada com 1 mL da solução de Lowry (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e deixado por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi acrescentado à mistura 1mL de reagente de Folin e Ciocalteau (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos, em temperatura ambiente. A seguir, a absorbância foi aferida a 680 nm em espectrofotômetro (Micronal® AJX 1900, Micronal, S.A., São Paulo, Brasil) e o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada pela albumina bovina, e expresso em µg/mL.

3.9.5 Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada após 10 dias de cultura celular, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica[®], Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Inicialmente, 50 µL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1. À solução foi acrescentada alíquota de 50 µL dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C em banho-maria. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na₂CO₃ a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal[®] AJX 1900, Micronal, S.A., São Paulo, Brasil) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 µmol de timolftaleína/hora/µg proteína.

3.9.6 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 dias de cultura. Para tanto, as células aderidas foram fixadas em solução de formol 10% por 2 horas à temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram desidratadas com uma série gradual de álcool e coradas com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich[®], Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), pH 4,2 por 10 minutos. O corante vermelho de Alizarina S cora áreas que são ricas em cálcio. Os poços das placas foram fotografados em microscopia de luz Axio HBO 100 (Carl Zeiss[®] Microimaging GmbH – Axiovert 40C, Alemanha), com aumento de 200 vezes.

A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). Para tanto, 800 µL de ácido acético 10% foram adicionados em cada um dos poços contendo as amostras e incubados em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Após este período, cada

uma das amostras foi raspada com auxílio de uma ponteira para a remoção de maior quantidade de corante. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrífuga com 1,5 mL e agitados em vórtex (Vórtex QL – 901, Biomex Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA- 095/CF, Marconi Equipamentos Para Laboratórios Ltda, Piracicaba, SP, Brasil) e aquecidos por 10 minutos, a 85°C sendo posteriormente transferidos para um becker com gelo por 5 minutos. Em seguida foram centrifugados (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemanha) por 20 minutos e 100 µL dos sobrenadantes foram transferidos para placa de 96 poços. Em cada poço foi acrescentado 40 µL de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (Biotek – EL808IU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos), sob o comprimento de onda de 405 nm. Os dados obtidos foram tabulados e armazenados para análise estatística.

4 Análise estatística

O cálculo do tamanho amostral foi realizado a partir das variáveis BIC e BAFO, utilizando valores de média e desvio padrão obtidos na literatura (Matsumoto et al., 2000; Leesungbok et al., 2013; Barak et al., 2016; Jing et al., 2016). Para um poder maior que 80% seria necessária uma amostra mínima de 42 animais.

Os dados obtidos após as avaliações foram submetidos à análise estatística através dos programas computacionais: MINITAB (Minitab[®], version 18.1, 2017) e GraphPad Prism (version 7, GraphPad[®] Software, La Jolla, California, Estados Unidos).

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

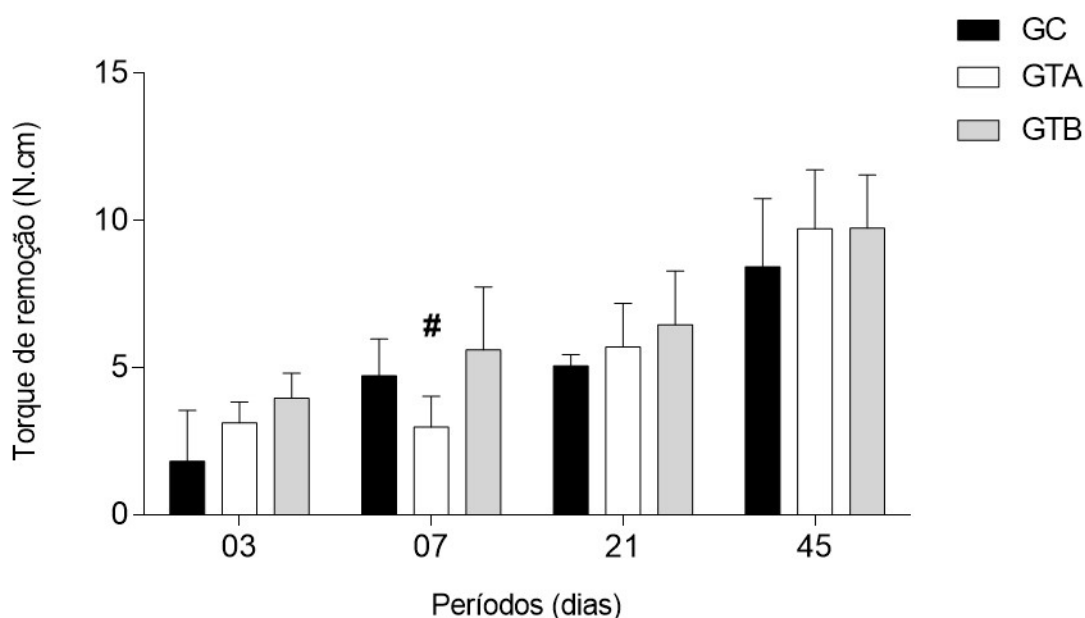
5 RESULTADO

Os resultados das análises *in vivo* e *in vitro* estão relatados a seguir.

5.1 Análise biomecânica

A avaliação do torque de remoção dos implantes revelou que na análise intergrupos GTB obteve resultados estatisticamente significantes em comparação ao GTA em 7 dias (GTB x GTA, $p=0.029$). Nos demais períodos, não houve diferenças entre os grupos (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do torque de remoção



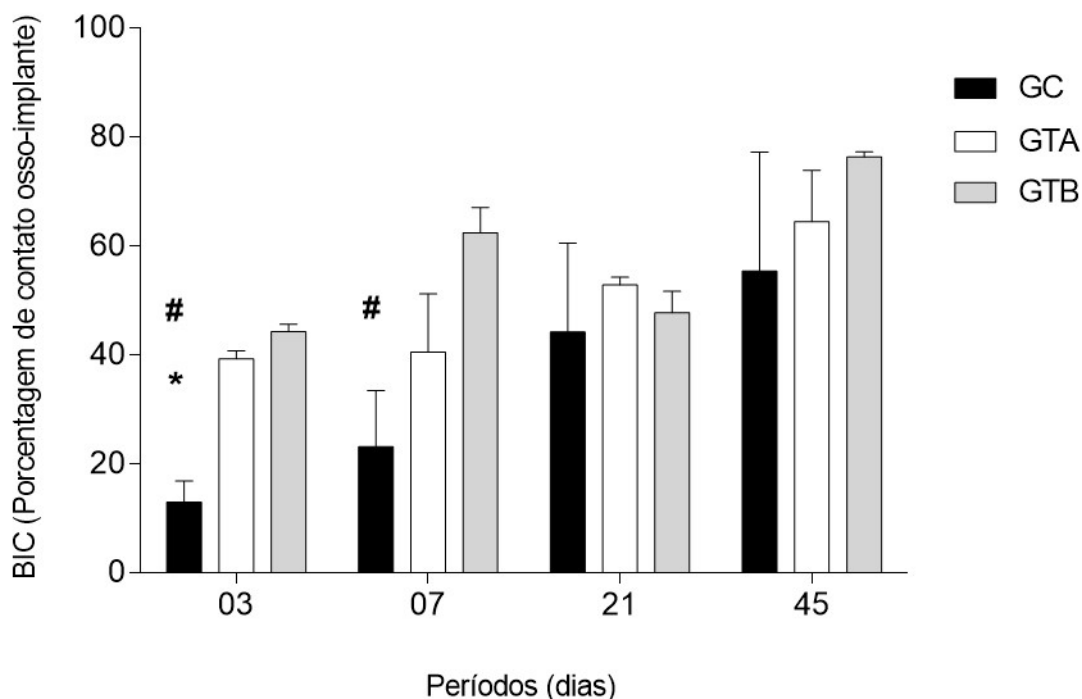
Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB ($p<0.05$), nos períodos experimentais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Análises histomorfométricas

A avaliação dos resultados das análises histomorfométricas estão revelados a seguir pelos gráficos (Figuras 11 e 12) e a prancha histológica (Figura 13). Na avaliação intergrupos da extensão linear do contato osso-implante (BIC) os dados revelaram que em 03 dias houve maior quantidade de osso em contato com o implante nos grupos GTA e GTB em comparação ao GC ($p=0.044$ e 0.017 , respectivamente). Em 07 dias, o GTB apresentou maior BIC em comparação ao grupo controle ($p=0.017$). Nos demais períodos não houve diferenças intergrupos para este parâmetro (Figura 11).

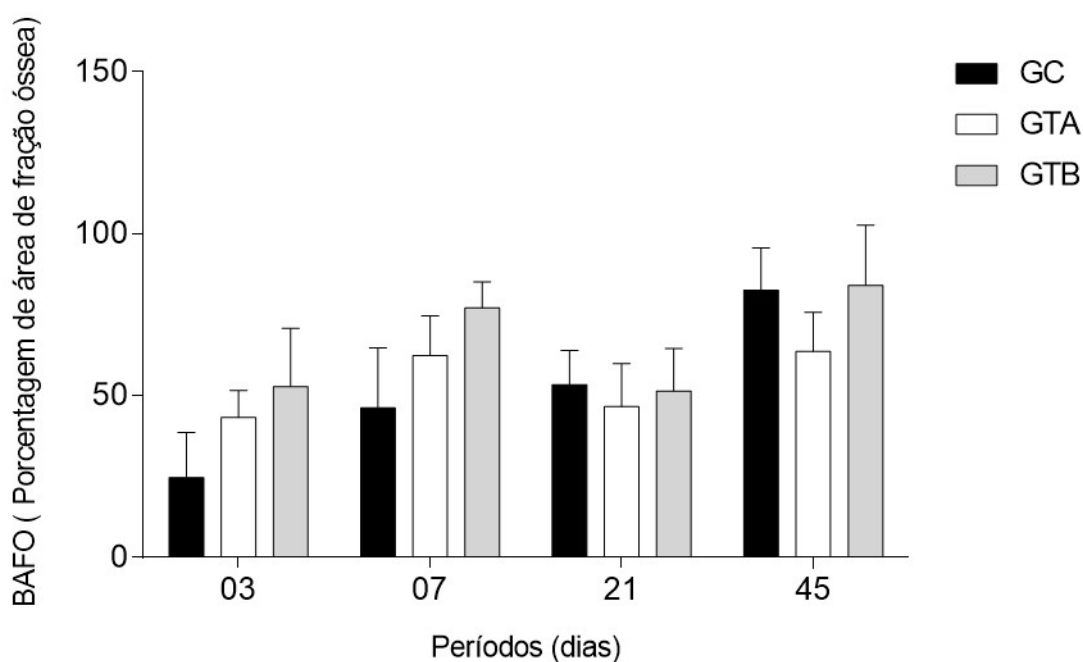
Figura 11 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do contato osso-implante (BIC)



Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB ($p<0.05$). * diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTA ($p<0.05$), nos períodos experimentais.
Fonte: Elaborado pelo autor.

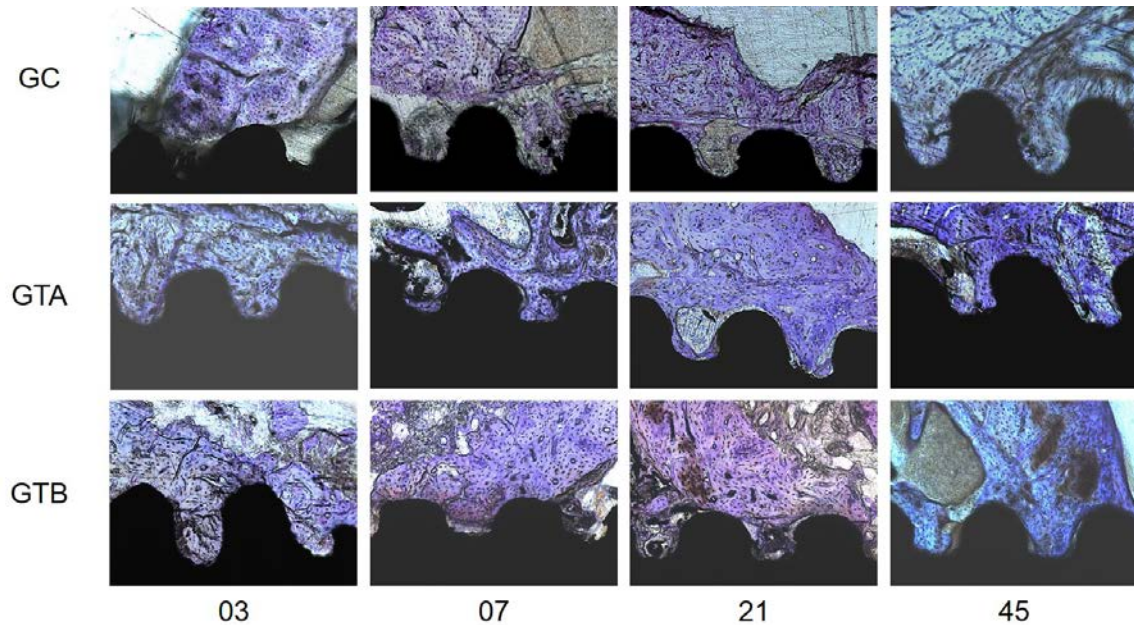
Na avaliação intergrupos da área de fração óssea nas espiras (BAFO) constatou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos períodos avaliados (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da porcentagem de área de fração óssea (BAFO)



Legenda: Gráfico representativo da porcentagem da área de fração óssea nas espiras em cada grupo. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos períodos analisados.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Figura representativa das lâminas utilizadas nas análises histomorfométricas nos períodos e grupos experimentais



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Avaliação radiográfica tridimensional (microCT)

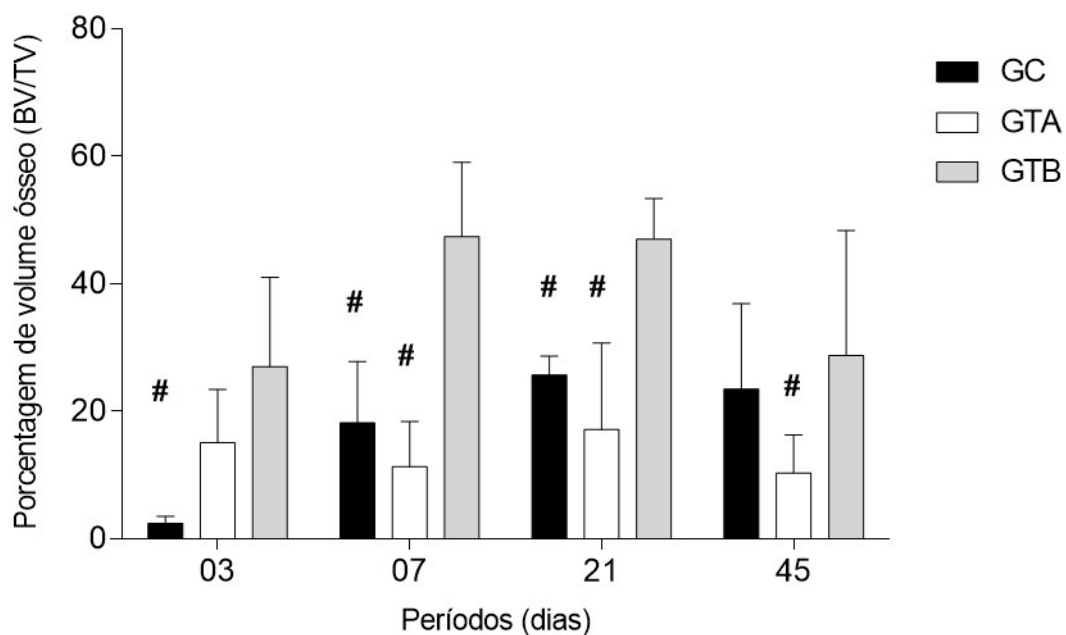
5.3.1 Porcentagem de volume ósseo

Após a reconstrução e reorientação das imagens foi possível avaliar a porcentagem de volume ósseo em cada grupo experimental.

Os dados obtidos revelaram que houve diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupos para todos os períodos, e que o GTB apresentou maior porcentagem de volume ósseo em comparação ao GC em 03 dias ($p=0.0002$); em 07 dias na comparação entre o GC ($p=0.0002$) e GTA ($p<0.0001$), e em 21 dias na comparação entre GC ($p=0.0079$) e GTA ($p=0.0002$). Em 45 dias a diferença estatística foi entre os grupos teste A e B ($p=0.0241$), em que novamente o

GTB apresentou maior porcentagem de volume ósseo (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da porcentagem de volume ósseo (BV/TV)



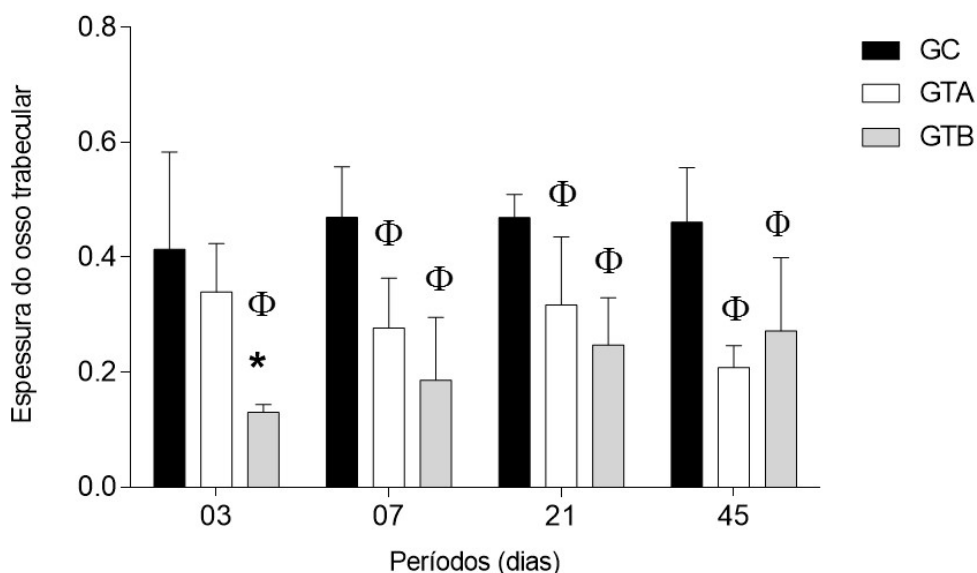
Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB ($p < 0.05$) nos períodos experimentais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Espessura do osso trabecular

Na avaliação da espessura trabecular os dados revelaram que o GC apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste em todos os períodos. O GTA apresentou maior espessura trabecular que o GTB apenas em 03 dias ($p < 0.0001$) (Figura 15).

Figura 15 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da espessura do osso trabecular

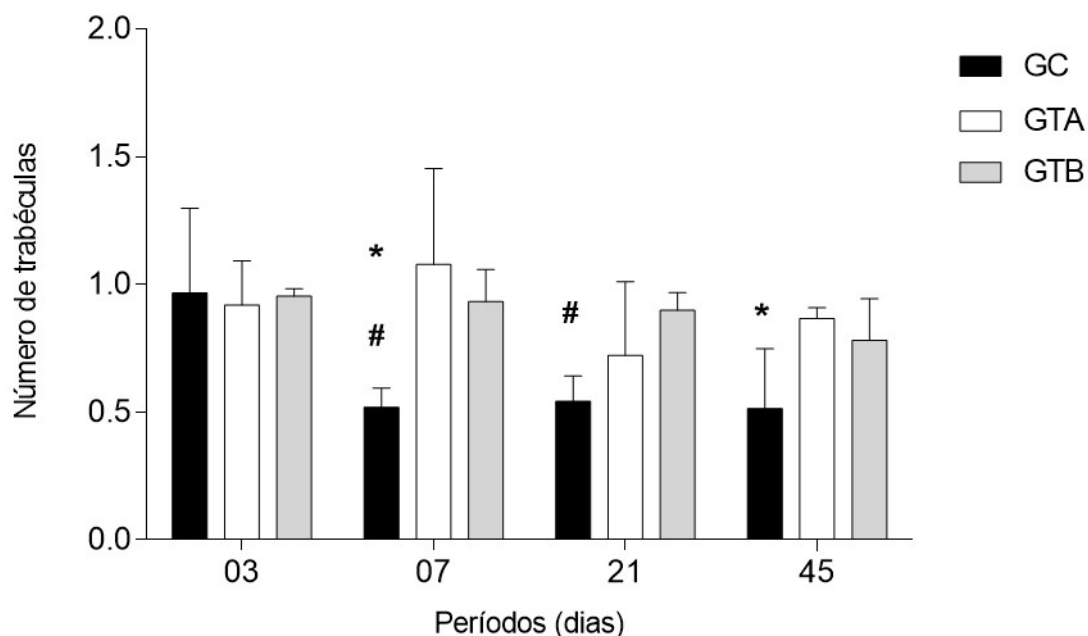


Legenda: * diferença estatisticamente significante comparada com o grupo GTA; φ diferença estatisticamente significante comparada com o grupo GC, nos períodos experimentais ($p < 0.05$).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Número de trabéculas

Na avaliação do número de trabéculas os dados revelaram que os grupos GTA ($p=0.0002$) e GTB ($p=0.0058$) apresentaram maior quantidade de trabéculas em comparação ao grupo controle GC em 07 dias. Em 21 dias, o GTB apresentou maior quantidade de trabéculas em comparação ao GC ($p=0.0197$) e, em 45 dias, o GTA apresentou melhor resultado em comparação ao GC ($p=0.0212$) (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do número de trabéculas

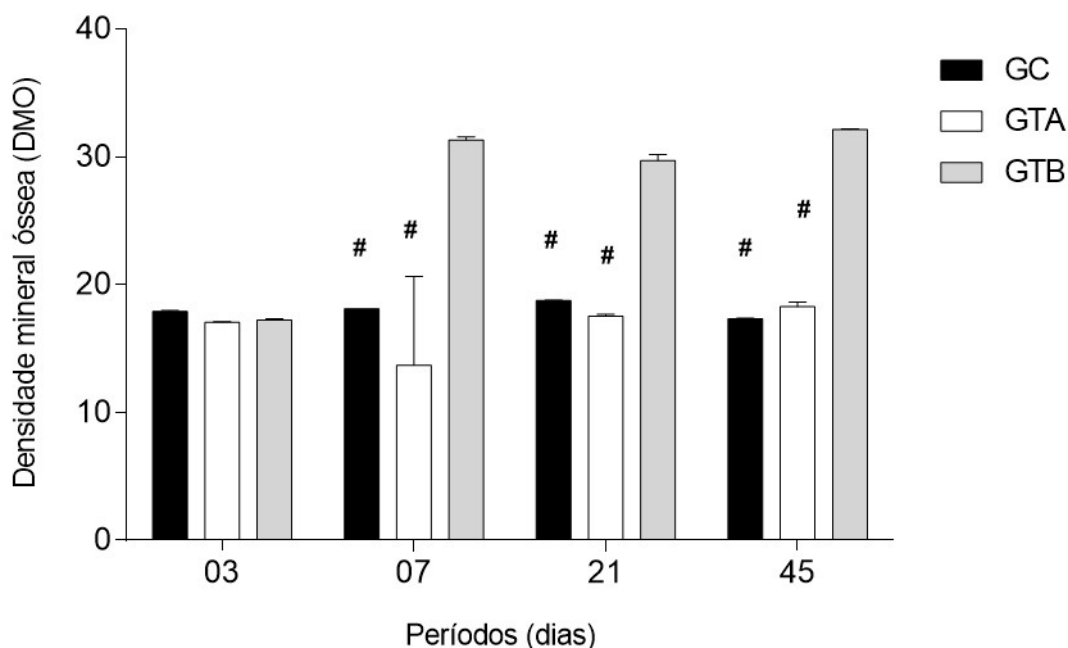


Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB; * diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTA, nos períodos experimentais ($p < 0.05$).
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.4 Densidade mineral óssea

Na avaliação da densidade mineral óssea (DMO) os dados revelaram que para os períodos de 07, 21 e 45 dias o GTB apresentou maior DMO em comparação aos grupos GC e GTA com $p < 0.0001$, em ambos os grupos, no período de 07 dias. Da mesma maneira foi observado em 21 dias, na comparação entre os grupos GC ($p = 0.0004$) e GTA ($p = 0.0002$), e em 45 dias com $p < 0.0001$, tanto para GC quanto para GTA. No período de 03 dias não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos (Figura 17).

Figura 17 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da densidade mineral óssea



Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB nos períodos experimentais ($p < 0.05$).

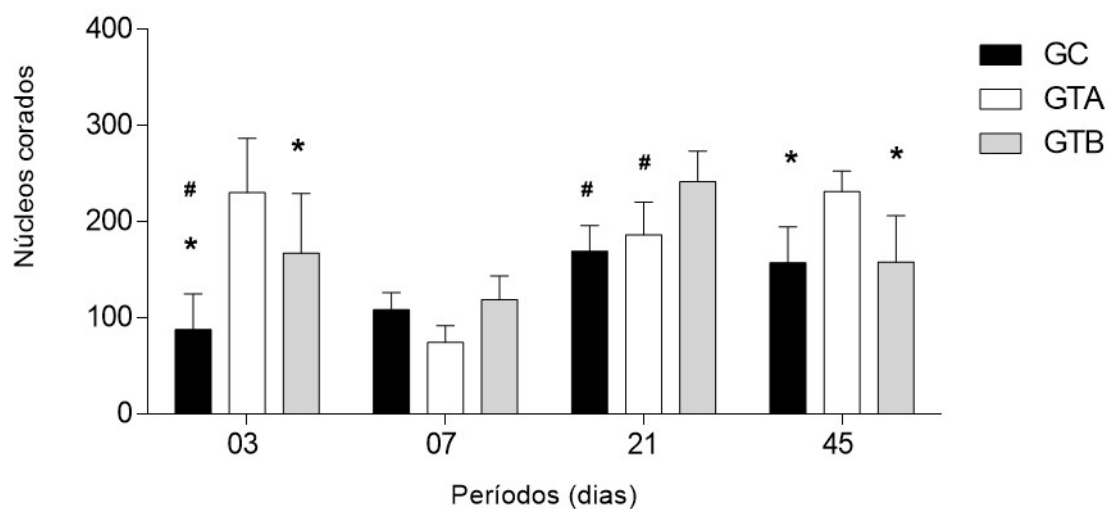
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Avaliação dos ensaios *in vitro*

5.4.1 Avaliação da proliferação celular

Os dados da avaliação da proliferação celular, através da vitalidade celular pela marcação do DNA pelo corante DAPI, revelaram que, na comparação intergrupos, a maior quantidade de núcleos corados pode ser observada em GTA quando comparado ao GC ($p < 0.0001$) e ao GTB ($p = 0.0033$), em 03 dias; assim como em 45 dias, GC ($p = 0.0030$) e GTB ($p = 0.0033$). O grupo GTB teve maior expressão de núcleos corados em comparação ao GC ($p = 0.0014$) em 03 dias e, em 21 dias comparado ao GC ($p = 0.0033$) e GTA ($p = 0.0034$) (Figuras 18 e 19).

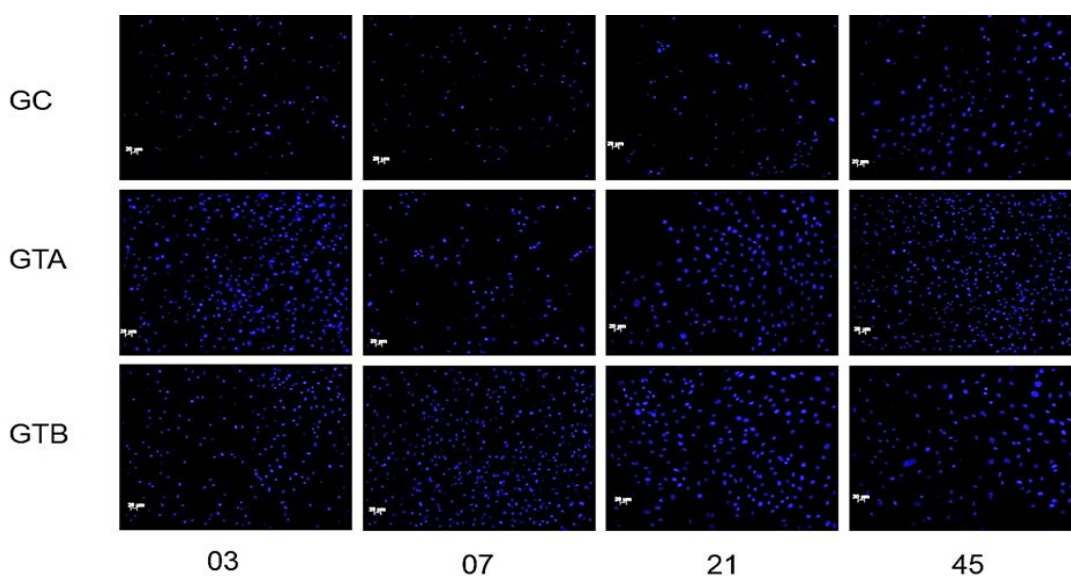
Figura 18 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da proliferação celular



Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB, * diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTA, nos períodos experimentais ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Proliferação celular



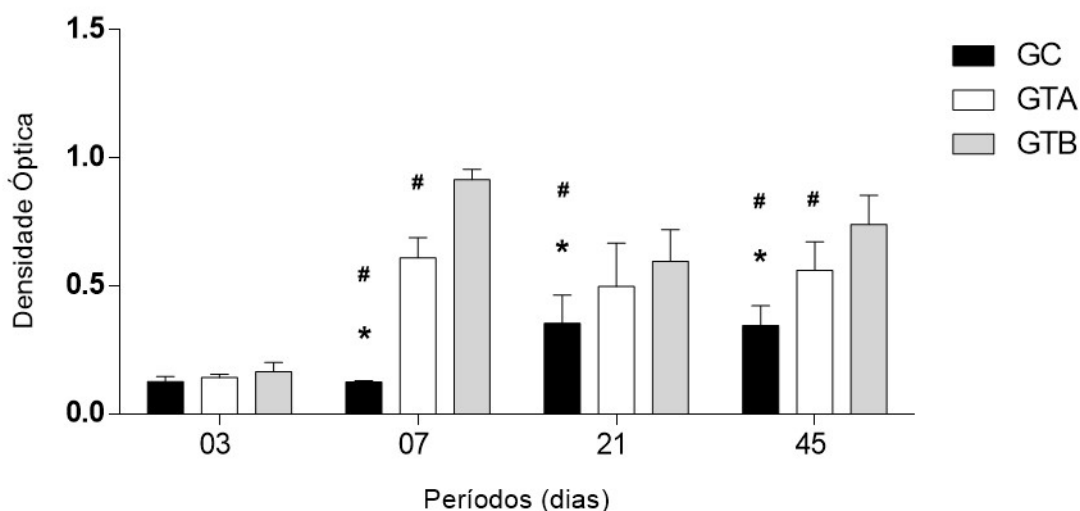
Legenda: representação esquemática da proliferação celular a partir dos núcleos corados com DAPI entre os grupos experimentais nos períodos avaliados. Microscopia de fase invertida, aumento de 200x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Após a exposição das células ao agente citotóxico MTT, a viabilidade celular foi mensurada a partir da densidade óptica de cada poço da placa e para cada subgrupo. A análise dos dados revelou que, em 03 dias não houve diferença estatística significativa entre os três grupos para a condição avaliada. Entretanto, na comparação entre os grupos que receberam o tratamento, o GTB foi o que apresentou maior quantidade de células viáveis após a exposição ao MTT comparado ao GTA ($p < 0.0001$) em 07 dias e ($p = 0.0032$) em 45 dias (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da viabilidade celular



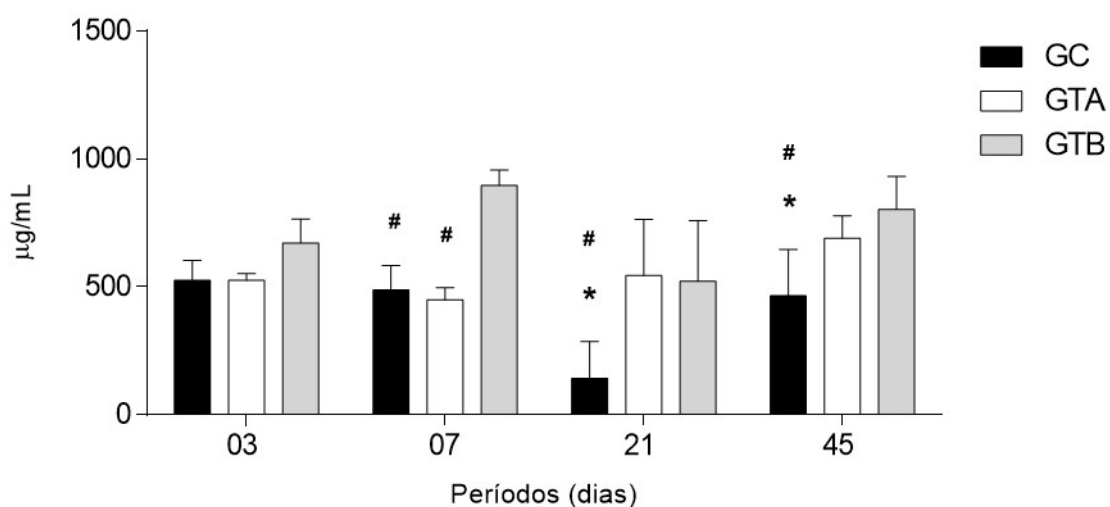
Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB, * diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTA, nos períodos experimentais ($p < 0.05$).
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.3 Conteúdo de Proteína total

Os dados obtidos da análise do conteúdo de proteína total mostraram que o grupo GTB apresentou uma maior quantidade em comparação ao GTA ($p < 0.0001$),

em 07 dias, e em comparação ao GC nos períodos de 07, 21 ($p < 0.0001$) e em 45 dias ($p = 0.0001$) (Figura 21).

Figura 21 - Gráfico representativo da comparação intergrupos do conteúdo de proteína total

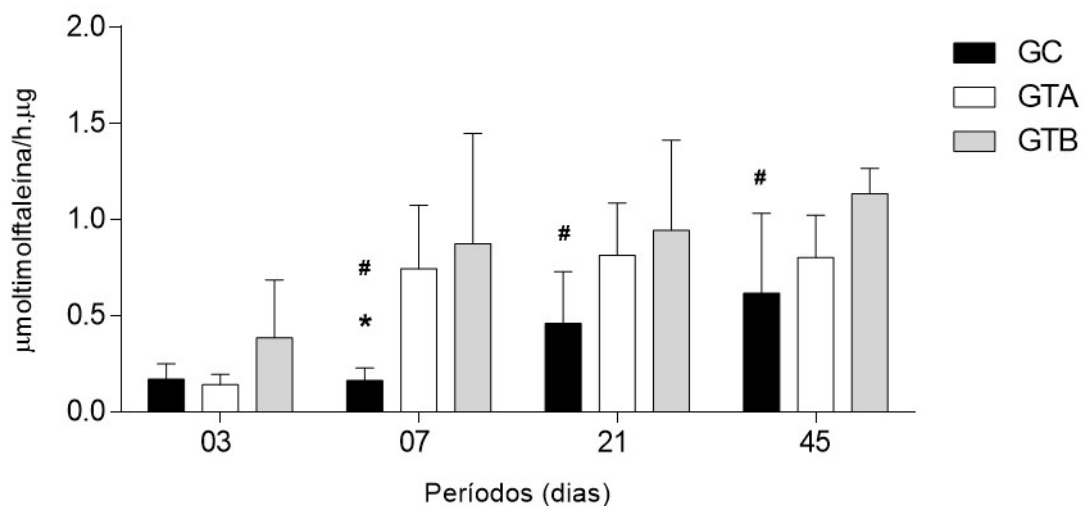


Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB, * diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTA, nos períodos experimentais ($p < 0.05$).
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.4 Atividade da Fosfatase alcalina

Os dados obtidos a partir da análise da atividade da fosfatase alcalina revelaram que o grupo GTB expressou maior quantidade de fosfatase alcalina em comparação ao GC nos períodos de 07 dias ($p = 0.0005$), 21 dias ($p = 0.0229$) e 45 dias ($p = 0.0145$). O grupo GTA expressou maior quantidade de fosfatase alcalina em comparação ao GC ($p = 0.0053$). No entanto, entre os grupos tratados com o CEMP não houve diferença estatística significativa para a expressão de fosfatase alcalina (Figura 22).

Figura 22 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da atividade da fosfatase alcalina



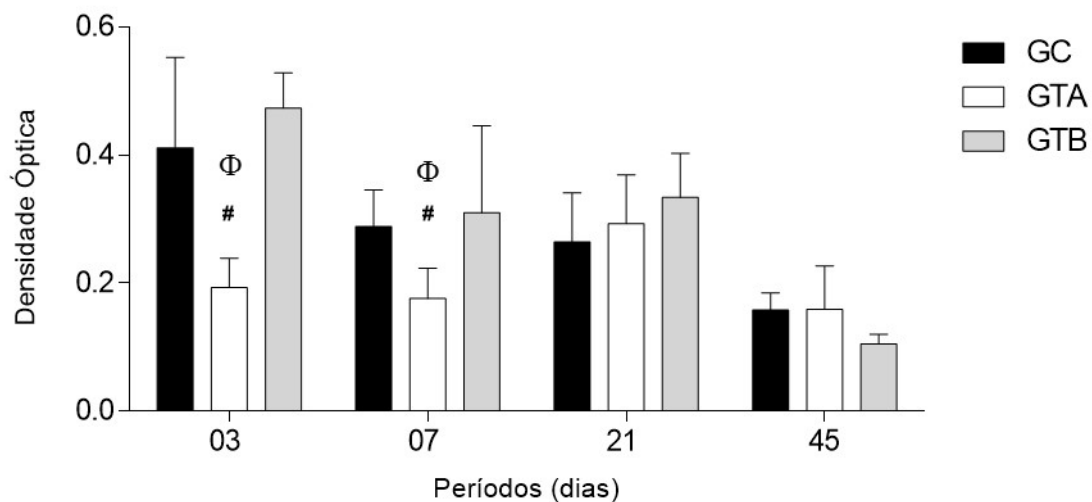
Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB, * diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTA, nos períodos experimentais ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.5 Quantificação dos nódulos de mineralização

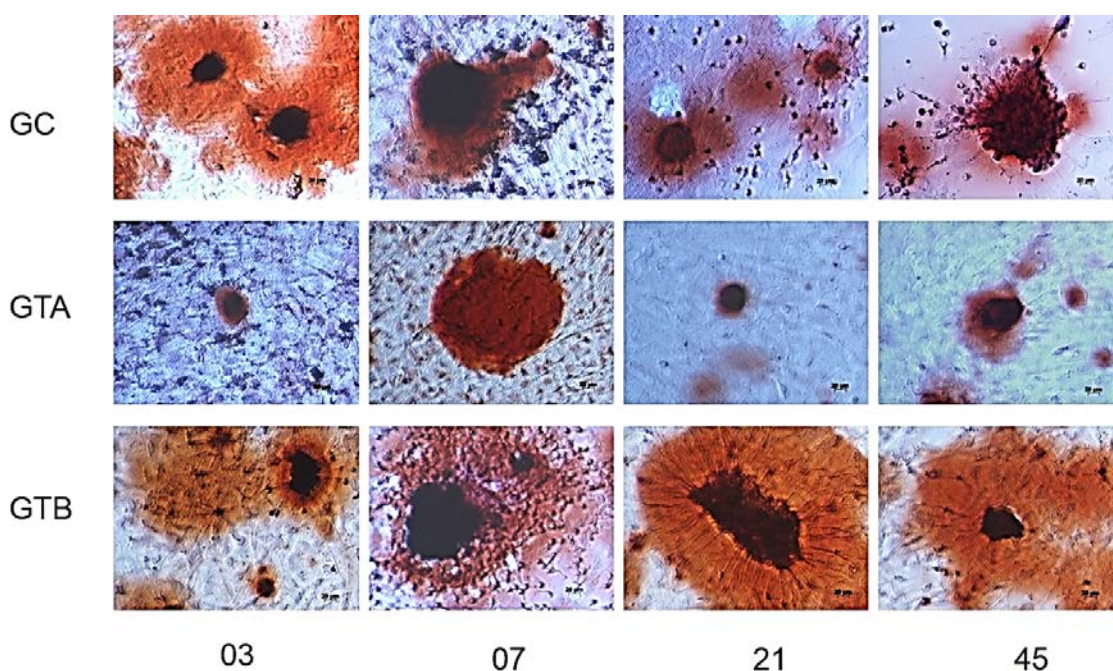
A formação e quantificação dos nódulos de mineralização foram avaliadas e os dados obtidos mostraram que o GTA expressou menor quantidade de nódulos de mineralização em comparação ao GTB ($p < 0.0001$) e GC ($p < 0.0001$), em 03 dias. Esse comportamento dos dados também se repetiu em 07 dias em que GTB ($p = 0.0104$) e GC ($p = 0.0372$) expressaram maior quantidade de nódulos de mineralização em relação ao GTA. Nos demais períodos avaliados não houve diferenças entre os grupos (Figuras 23 e 24).

Figura 23 - Gráfico representativo da comparação intergrupos da formação e quantificação dos nódulos de mineralização



Legenda: # diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GTB, Φ diferença estatisticamente significativa comparada com o grupo GC, nos períodos experimentais ($p < 0.05$).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Formação de nódulos de mineralização



Legenda: representação esquemática da formação de nódulos de mineralização entre os grupos experimentais nos períodos avaliados. Microscopia de fase invertida, aumento de 200x.
Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Recentemente, de acordo com Daish et al. (2018), muitas pesquisas têm sido desenvolvidas visando os efeitos biológicos do CEMP em diferentes parâmetros (formas de onda, frequência e intensidade), em diferentes tecidos, e em diferentes situações clínicas (Ehnert et al., 2015; Massari et al., 2019; Suryani et al., 2019), porém sem um consenso sobre os parâmetros ideais para seu uso na osseointegração.

Considerando a necessidade de entender essa interação do CEMP e a osseointegração, o presente estudo avaliou a hipótese de que a utilização adjuvante do CEMP otimizaria o processo de osseointegração de implantes de titânio através de análises biomecânicas, microtomográficas, histomorfométricas e ensaios biológicos *in vitro*. Para isso, foram considerados os parâmetros de 15 Hz de frequência e ± 1 mT para a força do campo eletromagnético, que são tendências evidenciadas na literatura responsáveis pelo aumento da diferenciação osteogênica *in vitro* (Schwartz et al., 2008; Jansen et al., 2010; Kaivosoja et al., 2015; Ross et al., 2015; Galli et al., 2018).

Os resultados biomecânicos com o torque de remoção, que representa a força necessária para desprender completamente o implante de titânio do tecido ósseo, demonstraram que houve superioridade na análise estatística intergrupo para o grupo de menor tempo de exposição ao CEMP (GTB) em relação ao que foi exposto por mais tempo ao CEMP (GTA) em 7 dias, com maiores valores de torque de remoção neste período. Os estudos em animais demonstram que as diferenças estatísticas no torque de remoção ocorrem em períodos precoces da osseointegração, corroborando com os resultados deste trabalho (Omar et al., 2011; Wennerberg, Albrektsson, 2009). Embora esta análise seja uma forma indireta de observar a osseointegração já foi sugerido que é uma medida válida para esta avaliação (de Molon et al., 2013).

Na avaliação dos dados da análise histomorfométrica foram utilizados os parâmetros de BIC e BAFO que são medidas bem estabelecidas na literatura para avaliação da osseointegração. Os resultados do presente estudo revelaram que, para a extensão linear do tecido ósseo em contato com o implante (BIC), não houve

diferença entre os grupos expostos ao CEMP. No entanto, esses grupos foram superiores ao controle e, maior BIC foi observado na comparação de GTB e o controle nos períodos iniciais da cicatrização óssea. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Jing et al., 2016, no qual a aplicação do CEMP (15 Hz e 2 mT) promoveu maiores valores para BIC e para a fração de área óssea ocupada nas espiras (BAFO) em comparação ao grupo controle. No entanto, apesar do CEMP promover maior quantidade de BAFO comparado ao controle nos períodos iniciais, os resultados do presente estudo não revelaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Com a aplicação do CEMP de 10 Hz (0.2 e 0.4 mT), o grupo de Barak et al. (2016) revelou um aumento no BIC apenas em 14 dias de avaliação diferente do nosso estudo em que, a partir do terceiro dia, já foi possível notar o aumento deste parâmetro nos grupos expostos em comparação ao controle. Ao comparar os resultados dos estudos de Matsumoto et al. (2000), Özen et al. (2004) e Akca et al. (2007) (100 Hz, 4 horas diárias e 0.2 mT) nota-se que após 14 dias de CEMP há um aumento significativo tanto no BIC quanto em BAFO comparado ao controle, sendo os resultados para o contato do osso-implante semelhantes aos encontrados no presente estudo. Uma das possíveis justificativas para essa diferença em BIC e BAFO seria a incapacidade de o coágulo preencher toda a área de cicatrização, ou seja, o espaço entre a parede óssea do leito receptor e as espiras do implante. Como consequência, ocorre um comprometimento na formação de osso próximo ao centro do implante (Beutel et al., 2016). Esse fator pode ser devido ao protocolo de perfuração que, de acordo com Baires-Campos et al. (2015), resulta em diferentes respostas biológicas com valores mais altos de BIC e BAFO para perfurações intermediárias (Soares et al., 2015). Além disso, o design do implante, as dimensões da área de cicatrização e o tipo de osso, segundo Soares et al. (2015), também exercem influência no processo de osseointegração do implante resultando em diferentes respostas biológicas que afetam as medidas histomorfométricas.

A avaliação radiográfica tridimensional através da microtomografia computadorizada (microCT) permite analisar os parâmetros morfológicos do tecido ósseo após a exposição à um determinado tratamento, representando indiretamente, o estado de saúde do tecido (Bouxsein et al., 2010; Soares et al., 2015). Os resultados desta análise revelaram que, dentre os grupos avaliados, o menor tempo

de exposição ao CEMP promoveu maior proporção de volume ósseo/volume total (BV/TV) em todos os períodos analisados. Esse achado é controverso aos de Ibiwoye et al. (2004), em que a aplicação de CEMP (15 Hz, 2 mT 3 horas diárias) promoveu um sutil aumento no volume ósseo em comparação ao controle.

Entretanto, em relação à espessura trabecular (Tb.Th) o grupo de 3 horas de exposição apresentou melhor resultado em 03 dias e, na avaliação do número de trabéculas (Tb.N) não houve diferença entre os grupos expostos ao CEMP nos períodos. Esses achados corroboram com o estudo de Jing et al. (2016) no qual com uso do CEMP (15 Hz e 2 mT) observaram melhora significativa nos parâmetros de arquitetura óssea em comparação ao grupo controle. Apesar de utilizarem parâmetros do CEMP diferentes, Akca et al. (2007), em um estudo com implantes de titânio inseridos em tíbias de animais ovariectomizados, observaram que o CEMP de 50 Hz e 0.2 mT por 4 horas diárias também promoveu maiores taxas de volume ósseo, corroborando com o presente estudo, porém, ao contrário de nossos achados, notaram um aumento no número de trabéculas ósseas. Em relação à densidade mineral óssea (DMO), o menor tempo de exposição ao CEMP promoveu valores superiores aos grupos GTA e controle, da mesma maneira que no estudo de Luo et al. (2005), em que o CEMP com intensidade de 1 mT promoveu melhores efeitos na DMO e integridade estrutural óssea em comparação à intensidade de CEMP de 2 mT (Suryani et al., 2019). Com resultados semelhantes, Shen e Zhao (2010) mostraram que a aplicação de CEMP (15 Hz, 0.8 mT) promoveu maior DMO em comparação ao controle. Entretanto, há uma tendência na literatura de que os parâmetros de 15 Hz e 1 mT promovem um aumento na diferenciação osteogênica *in vitro* (Ross et al., 2015).

Os fenômenos observados *in vivo* podem ser elucidados pelas análises *in vitro* do comportamento celular após a exposição ao CEMP. As células mesenquimais permanecem em estágio indiferenciado até receberem sinais de ativação apropriados e iniciar o processo de diferenciação em linhagens específicas, de acordo com o tipo de estímulo recebido (Jazayeri et al., 2017) e a aplicação de um estímulo biofísico auxilia neste processo (Galli et al., 2018). Essa constatação também pode ser observada por Bagheri et al. (2016) em que a atuação do CEMP ocorre na diferenciação osteogênica de células mesenquimais, auxiliando nos diferentes estágios celular, proporcionando um aumento na proliferação celular.

Considerando os achados destes autores, no presente estudo também foi observado um significativo aumento na proliferação celular nos grupos expostos ao CEMP em relação ao controle no período inicial de avaliação. Os resultados encontrados por Chang et al. (2004) e Wang et al. (2014) com 15 Hz e 0.1 mT e 0.9 mT de CEMP, respectivamente, também corroboram com este estudo, porém, também notamos o mesmo comportamento nos períodos tardios, ao contrário dos achados por Diniz et al. (2002) em cultura celular com 15 Hz e 7 mT de CEMP. Segundo Zhai et al. (2016), a proliferação osteoblástica é um indicador crítico para as atividades destas células pois, a partir deste evento, ocorre o aumento da diferenciação e mineralização celular. Com isso, os resultados de outras análises *in vitro* realizadas neste estudo estão de acordo com a literatura, como serão vistos a seguir.

Na avaliação da viabilidade celular após a exposição ao MTT, os grupos expostos apresentaram maior quantidade de osteoblastos viáveis em comparação ao controle, porém, nos estágios inicial e final, o menor tempo de exposição mostrou superioridade em relação ao maior tempo de CEMP. De acordo com Daish et al. (2018), a aplicação do CEMP influencia significativamente a osteogênese pelo aumento da expressão gênica, da deposição de matriz óssea, da proliferação celular e da diferenciação destas células, como observado em nosso estudo. Além disso, há também a produção de fosfatase alcalina (ALP), uma importante proteína extracelular marcadora da diferenciação osteoblástica. A detecção desta exoenzima inicialmente é expressa em períodos precoces da indução da mineralização, podendo ser usada como um marcador precedente da osteogênese (Mornet et al., 2001; Douglas et al., 2012). Segundo Chen et al. (2019), à medida que o tempo de indução da proliferação celular aumenta e a diferenciação osteogênica das células progride, a atividade da ALP aumenta gradualmente. Nossos resultados revelaram que a quantificação de fosfatase alcalina foi maior nos grupos expostos ao CEMP em relação ao controle desde os períodos iniciais da avaliação, corroborando com a literatura (Chang et al., 2004, Emes et al., 2013; Ross et al., 2015; Daish et al., 2018), entretanto, não foi observada diferença na quantidade expressa desta proteína entre os tempos de exposição. Ao contrário, o estudo de Chang et al. (2004) mostrou que a atividade da ALP foi menor após a exposição ao CEMP, embora constatassem o aumento na proliferação e na viabilidade celular. Ainda segundo os autores, para os parâmetros do CEMP de 15 Hz e 0.1 mT o efeito restringiu-se à proliferação e não

causou diferenciação celular.

O estágio final após a diferenciação celular dos osteoblastos é a mineralização da matriz extracelular. Segundo Chen et al. (2019), a capacidade de diferenciação dessas células pode ser identificada a partir da deposição de sal de cálcio na matriz celular através da coloração com vermelho de alizarina. A alteração dos níveis de sal de cálcio é um marcador da proliferação e diferenciação das células ósseas e do potencial osteogênico do tecido ósseo. Com isso, nossos resultados referentes à quantificação de nódulos de mineralização foram estatisticamente superiores nos períodos iniciais, no grupo com menor tempo de exposição e de acordo com Ross et al. (2015). Esses resultados sugerem que o menor tempo de exposição ao CEMP pode promover melhor resposta de osseointegração dos implantes.

Embora exista a dificuldade de comparação de todos os parâmetros avaliados entre os protocolos dos diferentes estudos devido a variabilidade dos modelos utilizados no CEMP gerando diferentes resultados (De Haas et al., 1979), nota-se, de uma maneira geral, que o uso adjunto desta terapia melhora as medidas de avaliação disponíveis para osseointegração tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em relação ao controle (Naito et al., 2019). De acordo com Wang et al. (2007), o motivo que gera essa discrepância na literatura está nos diferentes fenótipos das células utilizadas, nas diferentes frequências e intensidades de CEMP e nos diferentes períodos experimentais selecionados para análise. Além disso, os autores ressaltam que, embora permaneça a controvérsia acerca dos efeitos exatos sobre as funções dos osteoblastos, o consenso é que a aplicação adjunta do CEMP exerce um efeito osteogênico reprodutível. Um fator limitador do uso desta técnica é que, em grande parte dos estudos na literatura, (Matsumoto et al., 2000; Fini et al., 2002; Akca et al., 2007; Schwartz et al., 2008; Kaivosoja et al., 2015; Zhai et al., 2016; Jazayeri et al., 2017; Tong et al., 2017; Waldorff et al., 2017; He et al., 2018) a aplicação do CEMP ocorre em períodos de estimulação extensos, que no contexto da terapia adjunta aos implantes, poderia tornar difícil a adesão da técnica pelos pacientes, independente da dose administrada (Akca et al., 2007). Os estudos clínicos com dispositivos existentes no mercado revelaram que, apesar dos resultados bem-sucedidos, eles operam sob as mesmas propriedades para cada paciente, sem considerar os diferentes biótipos, a morfologia da região ou localização da fratura

(Daish et al., 2018).

O presente estudo visou, a partir de parâmetros de CEMP considerados adequados para o tecido alvo, a otimização da cicatrização óssea em ensaios pré-clínicos alcançando resultados satisfatórios que, dentro das limitações da técnica e do modelo de estudo, contribuem para a validação do uso da terapia adjunta à instalação de implantes, além de favorecer outras pesquisas para o melhor entendimento dos mecanismos de ação no reparo ósseo.

7 CONCLUSÃO

Considerando as limitações do presente estudo, a aplicação do campo eletromagnético pulsado como um bioestimulador foi efetivo na otimização dos eventos no tecido ósseo que acarretam na osseointegração, especialmente quando aplicado por menor tempo e nos períodos iniciais da cicatrização óssea.

REFERÊNCIAS*

Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Ortop Rel Res*. 2004 419:30-7. Review. PubMed PMID: 15021128.

Aaron RK, Ciombor DM. Therapeutic effects of electromagnetic fields in the stimulation of connective tissue repair. *J Cell Biochem*. 1993 May; 52(1):42-6. Review. PubMed PMID: 8320274.

Ajami E, Bell S, Liddell RS, Davies JE. Early bone anchorage to micro- and nano-topographically complex implant surfaces in hyperglycemia. *Acta Biomater*. 2016 Jul 15;39:169-79. doi: 10.1016/j.actbio.2016.05.017. PubMed PMID: 27181877.

Akca K, Sarac E, Baysal U, Fanuscu M, Chang T-L, Cehreli M. Micro-morphologic changes around biophysically stimulated titanium implants in ovariectomized rats. *Head Face Med*. 2007 Jul 16;3:2B. PMID: 17634134.

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

Bagheri L, Pellati A, Rizzo P, Aquila G, Massari L, De Mattei M, Ongaro A. Notch pathway is active during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells induced by pulsed electromagnetic fields. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Feb;12(2):304-315. doi: 10.1002/term.2455. Epub 2017 Jul 28. PubMed PMID: 28482141.

Baires-Campos FE, Jimbo R, Bonfante EA, Fonseca-Oliveira MT, Moura C, Zanetta-Barbosa D, et al. Drilling dimension effects in early stages of osseointegration and implant stability in a canine model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015;20:471-479.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Braz J Pharmac. Sci*. 2005 Jan/Mar; 41(1):27-51.

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

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

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 26 set 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. Review. PubMed PMID: 20533309.

Branemark P-I. Osseointegration and its experimental studies. *J Prosthet Dent.* 1983 Sep; 50(3):399-410. Review. PubMed PMID: 6352924.

Branemark P-I, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977 16(1):1-132. PubMed PMID: 356184.

Buzzá EP, Shibli JA, Barbeiro RH, Barbosa JR. Effects of electromagnetic field on bone healing around commercially pure titanium surface: histologic and mechanical study in rabbits. *Impl Dent.* 2003;12(2):182-7. PubMed PMID:12861888.

Chang WH, Chen LH, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics.* 2004 Sep;25(6):457–65. PubMed PMID: 15300732.

Chen X, Chen Y, Hou Y, Song P, Zhou M, Nie M, Liu X. Modulation of proliferation and differentiation of gingiva-derived mesenchymal stem cells by concentrated growth factors: Potential implications in tissue engineering for dental regeneration and repair. *Int J Mol Med.* 2019 Jul;44(1):37-46. doi: 10.3892/ijmm.2019.4172.

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

de Andrade DP, de Vasconcellos LM, Carvalho IC, Forte LF, de Souza Santos EL, Prado RF, Santos DR, Cairo CA, Carvalho YR. Titanium-35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Nov 1;56:538-44. doi: 10.1016/j.msec.2015.07.026. PubMed PMID:

de Molon RS, Najarro JA, Morais-Camillo D, Verzola MHA, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio Jr E. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin. Oral Impl. Res.* 2013 Jul;24(7):831–7 doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02467.x. PubMed PMID: 22509797.

De Haas WG, Lazarovici MA, Morrison DM. The effect of low frequency magnetic fields on the healing of the osteotomized rabbit radius. *Clin Orthop Relat Res.* 1979 Nov-Dec;(145):245-51. PubMed PMID: 317036.

Dergin G, Akta M, Gürsoy B, Devecioglu Y, Kürkçü M, Benlidayi E. Direct current electric stimulation in implant osseointegration: an experimental animal study with

sheep. *J Oral Implantol*. 2013 Dec;39(6):671-9. doi:10.1563/AAID-JOI-D-10-00172. PubMed PMID: 22103684.

Dimitrou R, Babis GC. Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007 Jul-Sep;7(3):253-65. Review. PubMed PMID: 17947809.

Douglas TE, Messersmith PB, Chasan S, Mikos AG, de Mulder EL, Dickson G, Schaubroeck D, Balcaen L, Vanhaecke F, Dubruel P, Jansen JA, Leeuwenburgh SC. Enzymatic mineralization of hydrogels for bone tissue engineering by incorporation of alkaline phosphatase. *Macromol Biosci*. 2012 Aug;12(8):1077-89. doi: 10.1002/mabi.201100501. Epub 2012 May 30. PubMed PMID: 22648976.

Ehnert S, Falldorf K, Fentz AK, Ziegler P, Schröter S, Freude T, Ochs BG, Stacke C, Ronniger M, Sachtleben J, Nussler AK. Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure - Clinical implication possible. *Bone Rep*. 2015 Aug 18;3:48-56. doi: 10.1016/j.bonr.2015.08.002. eCollection 2015 Dec. PubMed PMID: 28377966.

Emes Y, Akça K, Aybar B, Yalçın S, Çavuşoğlu Y, Baysal U, İşsever H, Atalay B, Vural P, Ergüven M, Çehreli MC, Bilir A. Low-level laser therapy vs. Pulsed electromagnetic field on neonatal rat calvarial osteoblast-like cells. *Lasers Med Sci*. 2013 May;28(3):901-9. doi: 10.1007/s10103-012-1165-5.

Fadly M, Selim H, Katamish M, Metwally S. Evaluation of the effect of pulsed electromagnetic fields on osseointegration of immediate dental implants. *Egypt J Oral Maxillofac Surg*. 2014 5. 84-91. doi: 10.1097/01.OMX.0000451843.25418.e1.

Ferro-Alves, ML. Influência da quimioterapia com 5-Fluorouracil na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos: avaliação biomecânica, microtomográfica, histomorfométrica, histoquímica e imunoistoquímica [dissertação]. Araçatuba (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2016.

Ferroni L, Tocco I, De Pieri A, Menarin M, Fermi E, Piattelli A, Gardin C, Zavan B. Pulsed magnetic therapy increases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells only if they are pre-committed. *Life Sci*. 2016 May 1;152:44-51. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.020.

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

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

Funk RH, Monsees TK. Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review. *Cells Tissues Organs*. 2006;182(2):59-78. Review. PubMed PMID: 16804297.

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. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 30254677.

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

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004 Jun 1;329(1):77-84. PubMed PMID:15136169.

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

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

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. PubMed PMID: 28965919.

Ibiwoye MO, Powell KA, Grabiner MD, Patterson TE, Sakai Y, Zborowski M, Wolfman A, Midura RJ. Bone mass is preserved in a critical-sized osteotomy by low energy pulsed electromagnetic fields as quantitated by in vivo micro-computed tomography. *J Orthop Res*. 2004 Sep;22(5):1086-93. PubMed PMID: 15304283.

Jansen JH, van der Jagt OP, Punt BJ, Verhaar JA, van Leeuwen JP, Weinans H, et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study. *BMC Musculoskelet Disord*.2010 Aug 23;11:188. doi: 10.1186/1471-2474-11-188. PubMed PMID: 20731873.

Jazayeri M, Shokrgozar MA, Haghhighipour N, Bolouri B, Mirahmadi F, Farokhi M. Effects of Electromagnetic Stimulation on Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells and Repair of Bone Lesions. *Cell J*. 2017 Apr-Jun;19(1):34-44. Epub 2016 Dec 21. PubMed PMID: 28367415.

Jing D, Zhai M, Tong S, Xu F, Cai J, Shen G, Wu Y, Li X, Xie K, Liu J, Xu Q, Luo E. Pulsed electromagnetic fields promote osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in bone defect repair through a Wnt/ β -catenin signaling-associated

mechanism. *Sci Rep.* 2016 Aug 24;6:32045. doi:10.1038/srep32045. PMID: 27555216.

Jing D, Li F, Jiang M, Cai J, Wu Y, Xie K, Wu X, Tang C, Liu J, Guo W, Shen G, Luo E. Pulsed electromagnetic fields improve bone microstructure and strength in ovariectomized rats through a Wnt/Lrp5/ β -catenin signaling-associated mechanism. *PLoS One.* 2013 Nov 14;8(11):e79377. doi:10.1371/journal.pone.0079377. PubMed PMID: 24244491; PubMed Central PMCID: PMC3828367.

Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, Konttinen YT. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Jan;9(1):31-40. doi: 10.1002/term.1612. Epub 2012 Oct 5. PubMed PMID: 23038647.

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

Leesungbok R, Ahn SJ, Lee SW, Park GH, Kang JS, Choi JJ. The Effects of a static magnetic field on bone formation around a sandblasted, large-grit, acid-etched-treated titanium implant. *J Oral Implantol.* 2013 39:S1, 248-255. doi: doi:10.1563/AAID-JOI-D-11-00101.

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

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75. PubMed PMID: 14907713.

Luo E, Jiao L, Shen G, Wu XM, Xu Q, Lu L. Effects of the PEMFs of different intensity on BMD and biomechanical properties of rabbits' femur. 2005 Dec;22(6):1168-70. PubMed PMID: 16422091.

Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2008 Oct 24;283(43):29119-25. doi: 10.1074/jbc.M801774200. PMID: 18703512.

Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants insert into the femur of rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2000. 2000 Aug; 11(4):345-60. PubMed PMID: 11168228.

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. Review. PubMed PMID: 30645684.

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

Mendonça G, Mendonça DBS, Simões LGP, Araújo AL, Golin AL, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJL. Efeito de superfícies de implantes nano-estruturadas na expressão de genes de osteoblastos e no contato osso-implante in vivo. *Rev Odontol Bras Central*. 2010; 19(50):196-204.

Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJ. Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Mar-Apr;24(2):205-15. PubMed PMID: 19492635.

Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol*. 2009 Jul;84(3):257-62. Review. English, Portuguese. PubMed PMID: 19668939.

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. PubMed PMID: 15936919.

Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Ménez A, Le Du MH. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem*. 2001 Aug 17;276(33):31171-8. Epub 2001 Jun 6. PubMed PMID: 11395499.

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

Naito Y, Yamada S, Jinno Y, Arai K, Galli S, Ichikawa T, Jimbo R. Bone-forming effect of a static magnetic field in rabbit femurs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2019 Mar/Apr;39(2):259-264. doi: 10.11607/prd.3220. PubMed PMID: 30794262.

Noriega-Luna B, Sabanero M, Sosa M, Aliva-Rodriguez M. Influence of pulsed magnetic fields on the morphology of bone cells in early stages of growth. *Micron*. 2011 Aug; 42(6): 600-7. doi: 10.1016/j.micron.2011.02.005. PubMed PMID:21474322.

Omar OM, Lennerås ME, Suska F, Emanuelsson L, Hall JM, Palmquist A, Thomsen P. The correlation between gene expression of proinflammatory markers and bone formation during osseointegration with titanium implants. *Biomaterials*. 2011

Jan;32(2):374-86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.011. PubMed PMID: 20933278.

Özen J, Atay A, Oruç S, Dalkiz M, Beydemir B, Develi S. Evaluation of pulsed electromagnetic fields on bone healing after implant placement in the rabbit mandibular model. *Turk J Med Sci.* 2004 34(2):91–95.

Parekh AB. Decoding cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Trends Biochem Sci.* 2011 Feb;36(2):78-87. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.013. Epub 2010 Aug 31. Review. PubMed PMID: 20810284.

Rajabi AH, Jaffe M, Arinzeh TL. Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review. *Acta Biomater.* 2015 Sep;24:12-23. doi:10.1016/j.actbio.2015.07.010. Review. PubMed PMID: 26162587.

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. Review. PubMed PMID: 26042793.

Scardueli, CR. Utilização sistêmica de estrôncio não radioativo como potencializador da osseointegração de implantes: avaliação biomecânica, microtomográfica e histomorfométrica em ratos [dissertação]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara; 2014.

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

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

Shayesteh YS, Eslami B, Dehghan MM, Vaziri H, Alikhassi M, Mangoli A, Khojasteh A. The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. *J Prosthodontol.* 2007 Sep-Oct;16(5):337-42. PubMed PMID: 17559534.

Shen WW, Zhao JH. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects BMD and local factor production of rats with disuse osteoporosis. *Bioelectromagnetics.* 2010 Feb;31(2):113-9. doi: 10.1002/bem.20535. PubMed PMID: 19670410.

Soares PB, Moura CC, Claudino M, Carvalho VF, Rocha FS, Zanetta-Barbosa D. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration: A Histomorphometric and Implant

Stability Study in Rabbits. *Braz Dent J.* 2015 Oct;26(5):451-7. doi: 10.1590/0103-6440201300411.

Suryani L, Too JH, Hassanbhai AM, Wen F, Lin DJ, Yu N, Teoh SH. Effects of Electromagnetic Field on Proliferation, Differentiation, and Mineralization of MC3T3 Cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019 Feb;25(2):114-125. doi:10.1089/ten.TEC.2018.0364. PubMed PMID: 30661463.

Tsai M, Lin Y, Chen W, Ho C, Huang H, Hsu J. Runx-2 and osterix gene expression in human bone marrow stromal cells are mediated by far-infrared radiation. *Proc World Congr Eng.* 2011 3: 1–5.

Tong J, Sun L, Zhu B, Fan Y, Ma X, Yu L, Zhang J. Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients. *Bioelectromagnetics.* 2017 Oct;38(7):541-549. doi: 10.1002/bem.22076. Epub 2017 Aug 18. PubMed PMID: 28833306.

Tucker JJ, Cirone JM, Morris TR, Nuss CA, Huegel J, Waldorff EI, Zhang N, Ryaby JT, Soslowsky LJ. Pulsed electromagnetic field therapy improves tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model. *J Orthop Res.* 2016 Jun 10. doi: 10.1002/jor.23333. PMID: 27282093.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005 Sep;29(3):151-9. Review. PubMed PMID: 16109794.

Zhai M, Jing D, Tong S, Wu Y, Wang P, Zeng Z, Shen G, Wang X, Xu Q, Luo E. Pulsed electromagnetic fields promote in vitro osteoblastogenesis through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Bioelectromagnetics.* 2016 Apr;37(3):152-162. doi: 10.1002/bem.21961. Epub 2016 Feb 18. PubMed PMID: 26891468.

Wang J, An Y, Li F, 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. PubMed PMID: 24140610.

Waldorff EI, Zhang N, Ryaby JT. Pulsed electromagnetic field applications: A corporate perspective. *J Orthop Translat.* 2017 Mar 31;9:60-68. doi: 10.1016/j.jot.2017.02.006. eCollection 2017 Apr. Review. PubMed PMID: 29662800.

Wennerberg A, Albrektsson T. Structural influence from calcium phosphate coatings and its possible effect on enhanced bone integration. *Acta Odontol Scand.* 2009;67(6):333-40. doi: 10.1080/00016350903188325. Review. PubMed PMID: 19722110.

Yoshida T, Kim WC, Kubo T. [Bone fracture and the healing mechanisms. Fracture treatment using electrical stimulation]. *Clin Calcium.* 2009 May;19(5):709-17. doi: CliCa0905709717. Review. PubMed PMID: 19398840.

APÊNDICE A – Artigo enviado para publicação no Periódico *Clinical Oral Implants Research*

Title: Evaluation of pulsed electromagnetic fields protocols in implants osseointegration: *in vivo* and *in vitro* study

Run title: Pulsed electromagnetic fields and implants osseointegration

Camilla Magnoni Moretto Nunes, DDS, MSc^{*}; Camila Lopes Ferreira, DDS, MSc^{*}; Daniella Vicensotto Bernardo, DDS, MSc, PhD^{*}; Cássia Carolina Rabelo Lopes DDS^{*}; Luma Collino, DDS^{*}; Daphne Camargo Reis Mello, DDS, MSc[§]; Luana Marotta Reis de Vasconcellos, DDS, MSc, PhD[§]; Maria Aparecida Neves Jardim, DDS, MSc, PhD^{*}.

^{*}Department of Diagnosis and Surgery, São Paulo State Univ. (UNESP), Institute of Science and Technology of São José dos Campos, Brazil.

[§]Department of Bioscience and Bucal Diagnosis, São Paulo State Univ. (UNESP), Institute of Science and Technology of São José dos Campos, Brazil.

Corresponding Author: Maria Aparecida Neves Jardim

Av Engenheiro Francisco José Longo, 777, São Dimas, São José dos Campos, São Paulo, ZipCode:12245-000, Brazil.

jardini@unesp.br

Phone: +55 39479043

Acknowledgments: The present study was funded by National Council for Scientific and Technological Development from Brazil, National Institute of Science and Technology Complex Fluids (INCT-FCx) - (CNPq – 465259/2014-6) and São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2014/50983-3).

Author contributions: M.A.N.J. conceived the ideas, C.M.M.N., C.L.F., D.V.B., C.C.R.L., L.C., D.C.R.M and L.M.R.V. collected the data, CMMN analysed the data;

and CMMN. and MANJ. led the writing.

ABSTRACT

Objectives: The present study aims to evaluate osseointegration based on protocols designed for the use of pulsed electromagnetic field (PEMF), and establish one that addresses ideal parameters for its use in dentistry, especially in the optimization of the implants osseointegration process. **Materials and Methods:** Sixty male rats (Wistar) were randomly divided and allocated into a three experimental groups: control, test A and test B. All animals received titanium implants in both tibias, and PEMF application occurred only in the test groups. They were euthanized at 03, 07, 21 and 45 days after PEMF exposure. Mechanical test, histomorphometrics measurements, three-dimensional radiographic evaluation and in vitro biological assays analyzes were performed, whose results were submitted to a statistical analysis. **Results:** Group B showed better results compared to group A in removal torque tests at 07 days; in bone volume and bone mineral density, both at 07, 21 and 45 days; cell proliferation at 21 days, cell viability at 07 and 45 days, total protein content at 07 days and mineralization nodules at 03 and 07 days. Group A showed better performance in trabecular bone thickness at 03 days and cell proliferation at 03 and 45 days compared to group B. In the histomorphometric analysis and number of trabeculae there were no differences between the test groups. **Conclusion:** Pulsed electromagnetic field as a biostimulator was effective in optimizing the events in bone tissue that lead osseointegration, especially when applied for a shorter time and in the initial periods of bone healing.

Keywords: Osseointegration. Electromagnetic Fields. Rats.

INTRODUCTION

It is a well-established fact in the literature that titanium has excellent mechanical properties and biocompatibility with bone tissue. However, the bone condition of the recipient bed and its healing capacity are critical factors in the process of

osseointegration (Özen et al., 2004; Elias, Meirelles, 2010), which can consume more time to promote the growth of bone tissue in biomaterial in dental and orthopedic treatments, in healthy patients (Hofmann, Bloebaum, Bachus, 1997) and especially in systemically compromised patients (Han, Xu, 2004; Leesunbok et al., 2013, Wang et al., 2014).

For optimizing the osseointegration process in prosthetic rehabilitation, adjuvant therapies such as biophysical stimulation have been studied to accelerate and improve bone regeneration (Bassett, Pawluk, Pilla, 1974; Dimitriou, Babis, 2007; Fadly, Selim, Katamish, Metwally, 2014; Gherardini, Ciuti, Tognarelli, Cinti, 2014 Ehnert et al., 2015). Because bone tissue has piezoelectric properties, ie, it produces electrical polarization when subjected to mechanical deformation (Fukada, Yasuda, 1957), human clinical trials and animal experiments have emerged associating bone repair through the therapeutic use of electricity (Rubin, McLeod, 1996; Matsumoto et al., 2000; Fini et al., 2004; Dimitrou, Babis., 2007; Fadly et al., 2014; Ferroni et al., 2016). Due to its action on various cell types and tissues (Hong, Kang, Yi, Kim, Cho, 2014; Seeliger, Falldorf, Sachtleben, Griensven, 2014; Zhou et al., 2014; Ehnert et al., 2015; He, Selvamurugan, Warshaw, Partridge, 2017), it becomes a safe and non-invasive treatment for various conditions such as ulcers, chronic inflammatory diseases, especially those affecting the bone tissue (Fadly et al, 2014;. Ferrone et al, 2014; Ehnert et al. 2015; Zhai et al., 2016; Waldorff, Zhang, Ryaby, 2017; Funk, 2018). In cellular processes, it is observed that there are small electrical currents produced from the normal functions of the body's reactions to generate electrically charged particles (Ferroni et al, 2016; Galli, Pedrazzi, Mattioli-Belmonte, Guizzardi, 2018). Furthermore, the cell membranes have an electrical potential (membrane potential) that separates the electric charges generated by the solute, such as sodium (Na^+) and chloride (Cl^-) that are in higher concentrations in the extracellular medium, and potassium (K^+) and more prevalent organic molecules in the intracellular environment (Ross et al., 2015). Changes in membrane potentials can be caused by changes in ionic movements across the cell membrane generating endogenous electromagnetic fields. These endogenous fields result, for example, from the movement of muscles, tendons, and actions of the musculoskeletal system (Ross et al., 2015; Hastings, Mahmud, 1988). The piezoelectricity of bone tissue has been suggested to be responsible for the repair of control and bone remodeling by

moving the extracellular fluid that transports ions in the bone matrix (Yoshida, Kim, Kubo, 2009; Ross et al, 2015; Galli, et al.). With the exogenous application of PEMF, the intracellular and extracellular mechanisms are activated, demonstrating their ability to permeate plasma and cell membranes (Ross et al., 2015; Massari et al., 2019). By pulsing the electromagnetic field (EMF) the increase is causes and reduction in ion fluxes generating electric current (Leesunbok et al, 2013; Kim et al, 2017) and the membrane potential is changed making it permeable, especially for calcium ion (Ca^{2+}), an important intracellular signaling (Parekh, 2011; Tong et al, 2017; Selvamurugan, He, Rifkin, Dabovic, Partridge, 2018). in inducing cell differentiation in osteoblasts (Ross et al, 2015; He, et al.; Tong et al., 2017; Galli, et al.; Naito et al., 2019). Thus, the PEMF affects the molecular chains and cause a specific transmembrane signaling that promotes osteogenic differentiation (Jazayeri et al, 2017, Tong et al, 2017; Suryani et al, 2019) from the stimulation of protein synthesis of the extracellular bone matrix (Ehnert et al., 2015, Selvamurugan, et al.). Thus, bone tissue becomes a favorable target for treatment with PEMF (Galli, et al.). However, although benefits obtained from the application of PEMF to bone tissue are observed, the literature also reveals that this therapy did not result in significant improvement of the osseointegration process (Buzzá, Shibli, Barbeiro, Barbosa, 2003) and also bone healing (22. Nascimento, Issa, Mello, Albuquerque Júnior, 2012) between treated and in vivo control groups, since the electromagnetic field does not affect bone turnover in pre-existing bone trabeculae (Barak et al., 2016).

In *in vitro* studies, the exposure time of osteoblast cultures to PEMF resulted in no effect on cell number, protein synthesis and core structure (Noriega-Luna, Sabanero, Sosa, Aliva-Rodriguez, 2011) and differentiation of osteoblasts (Chang, Chen, Sun, Lin, 2004). The authors question the variability of PEMF treatment protocols in *in vitro* and *in vivo* osseointegration of the studies available in the literature, especially in relation to the duration of its application in bone (Matsumoto et al., 2000; Lirani, Lazaretti-Castro, 2005; Akca et al., 2007; Dimitrou, Babis, 2007; Nascimento, et al.; Daish, Blanchard, Fox, Pivonka, Pirogova, 2018). Thus, the objective of this study was to evaluate the hypothesis that, based on protocols designed for the use of PEMF, it is possible to verify osseointegration and establish one that addresses ideal parameters for its use in dentistry, especially in the optimization of the osseointegration process of implants.

MATERIALS AND METHODS

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

The animals were randomized and allocated into 3 experimental groups according to a computer generated table: control group CG (n = 20), test group A (GTA, n = 20) with exposure to PEMF for 3 hours and group B (GTB), n = 20) with exposure to PEMF for 1 hour. All groups presented 4 subgroups regarding the euthanasia periods. All animals in the three groups received 3 titanium implants in the tibia (2 in the right tibia and 1 in the left tibia). The experiment lasted 60 days divided into 5 intervention periods in which the procedures were performed.

The sample size equal to 20 per group and power test up to 85% was performed from the primary variable, osseointegration, by the mean and standard deviation parameters of BIC and BAFO obtained in the literature (Akca et al., 2007; Barak et al., 2016; Jing et al., 2016).

Surgical procedure

Fifteen days after adaptation, the animals in each group underwent osseointegrated implant placement surgeries. As surgical procedures were initiated in the groups, the operated animals were exposed to PEMF (n = 5 animals at a time), according to the experimental group (GTA and GTB) until euthanasia consisting of short periods (subgroups 3 and 7 days), medium (subgroups 21 days) and late (subgroups 45 days) (Matsumoto et al., 2000; Mendonça et al., 2009; Omar et al., 2011).

For surgical procedure the animals were anesthetized by intramuscular injection of xylazine (13 mg/kg - Rompun®, Bayer; São Paulo, SP, Brazil) and ketamine (33 mg/kg - Dopalen®, Agribands do Brasil Ltda; Paulinia, SP, Brazil). The inner region of the left and right paws were trichotomized and disinfected, and a linear incision was performed in the internal region of the posterior portion of the paw, below the knee for exposure of the tibial metaphysis (de Molon et al., 2013). Subsequently, muscle tissue disruption and osteotomy were performed with the aid of drills and irrigation with sterile saline solution to prepare the area in which the implants were inserted. In the study took 180 pure titanium implants, surface machined, osseointegrated, threaded with 4.0 mm long by 2.2 mm (Titanium Fix®, The Technology Inc., São José dos Campos, SP, Brazil) inserted in both paws of each animal of the experimental groups. In the right paw, the first implant was inserted 7 mm away from the knee joint and the second placed 5 mm distally from the first. In the left paw an implant was inserted 7 mm from the knee joint until all screw threads were inside the cortical bone. Muscle tissue that was divulsed for tibial exposure was sutured with resorbable sutures (Vicryl Ethicon® 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, SP, Brazil) and skin with 4.0 silk thread (Ethicon® Johnson Prod., São José dos Campos, SP, Brazil). The animals finally received immediately after surgery a single dose of 5 mg/kg of ketoprofen (Laboratório Teuto Brasileiro S.A.; Anápolis, GO, Brazil) by the subcutaneous route for the control of postoperative pain.

Pulsed Electromagnetic Field Exposure (PEMF)

The PEMF display device was composed of a pulsed signal generator and Helmholtz coils. The rats were subjected to PEMF exposure with the following fixed parameters: 25 cycles of -1 mTesla to + 1 mTesla in 200 microseconds repeated at 15 Hz. The exposure to PEMF in test group A was 3 hours for 5 days a week (Midura et al., 2005; Androjna, Fort, Zborowski, Midura, 2014), whereas for test group B it was 1 hour per week, 5 days a week until the euthanasia (McLeod, Rubin, 1992). The control group animals were also placed in the cage between the coil set, but without PEMF activation, to simulate the stimulation and stress to which the other animals were submitted (Tucker et al 2016).

Euthanasia and histological processing

The animals were anesthetized on the periods 3, 7, 21 and 45 days. For each period, 5 animals were euthanized per experimental group. The left tibias of all animals were removed and immersed in a 10% paraformaldehyde buffered solution during 48 hours. After this period, the left tibias were immersed in a 70% alcohol until the moment of the three-dimensional radiographic analysis (Micro-CT) followed by histological slide preparation and subsequent histomorphometric analysis. The tibias of the right paws were removed, dissected and immersed inringer lactate solution in -80°C freezer until the implant removal torque measurements were performed.

Mechanical test

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

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

Three-dimensional radiographic evaluation (microCT)

The left tibias were submitted to analysis by computed microtomography. The parts were scanned by the SkyScan® microtomograph (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium) using 18 µm thick (89 kV and 275 µA) sections, with rotation and 0.1 mm copper and aluminum filter. The images obtained were stored and reconstituted by determining the area of interest by the NRecon® software (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium). With the Data Viewer® software (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium) the images were reconstructed and the samples were standardized in longitudinal position, which was more appropriate for the evaluation. Then the CTAnalyser - CTAn® software (SkyScan, Bruker MicroCT, Aatselaar, Belgium) defined an area around the implant delimited by 0.5 mm around the entire implant. From the threshold used in the analysis (25-90 gray shades) the images were obtained and the similarity with the bone tissue and the initial image

was verified, allowing to obtain the bone volume formed around the implants. A second analysis of the same image was performed because the absence of cover screw and, in some cases, there was bone tissue formation inside of the prosthetic platform. Thus, a second ROI was defined that comprised the prosthetic platform region. Then it was possible to analyze the percentage of bone volume, trabecular bone thickness and number and trabecular bone density of bone tissue (Bouxsein et al., 2010).

Processing of the histological slides

Briefly, after the computed microtomography procedure, the parts were washed in running water, dehydrated in increasing concentrations of alcohol. Then the pieces were immersed in xylol 98%. The pieces were transferred to the methyl methacrylate (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and dibutylphthalate (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) solution for 4 days, and then to the previous solution plus 1g benzoyl peroxide (VETEC chemical, Rio de Janeiro, Brazil) and kept in refrigerator for 4 days. For inclusion, the pieces were soaked in a new solution with 3g of benzoyl peroxide and, in small amber glasses (6x4 mm), where a pre-base of this mixture was placed. Then, the pieces were glued to this pre-base with instant glue (Super Bonder®, Loctite, Henkel Ltda., São Paulo, Brazil) and the solution was poured over the assembly into the glass. The glass was placed in the oven (37 ° C) until the solution was trapped. The block obtained was cut in the Labcut apparatus (Labcut® 1010 - Extec, Erios, Enfield, Connecticut, United States) with diamond cutting disc (Buehler® IsoMet® Chicago, Illinois, United States). The polishing of the cuts was performed with a polishing suspension (Extec® colloidal silica-Erios, Enfield, Connecticut, United States) on the cut side that was glued to the blades, with a felt disc on the polishing (Labpol® 8-12 Extec , Erios, Enfield, Connecticut, United States), to then be glued on plaxiglass histological slides. Then the cuts were worn on a polishing machine (Labpol® 8-12 Extec, Erios, Enfield, Connecticut, United States) using sandpaper (800 to 1200) until a thickness of approximately 0.25 mm was obtained being sufficient for visualization of structures under a light microscope. The slides were stained with 2% toluidine blue, stored in a

37°C oven and washed under running water. With the prepared histological slides, the histological images were captured for further histomorphometric analysis.

Histomorphometric analysis

The histomorphometric variables analyzed were the linear extension of the bone tissue in contact with the titanium (BIC) between the implant threads in the mesial and distal regions of the tibia through which it was possible to observe the amount and type of newly formed bone around the implant (de Molon et al., 2013). For the calculation of the occupied bone area fraction (BAFO), the total area of the evaluated threads and the area occupied by a bone space or absence were previously obtained, and then the percentage of the total area of threads occupied by bone tissue was determined. μm^2 . For the standardization of measurements a single examiner calibrated two more central regions selected through a 100x increase in microscopy Axiophot® (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to an AxioCam MRc® 5 digital camera (Carl Zeiss Oberkochen, Germany) and transmission to the computer program AxioVision® Release 4.7.2., allowing a better visualization of the region of interest, and calibration of 1840 pixels/ μm by another examiner CMMN. Two slide image captures (right and left side of the implant) were measured the histomorphometric variables. The images were coded by another examiner MANJ, blinded to the groups, so that an unbiased analysis of the data was performed. Histomorphometric analysis was performed using the public domain NIH Image J 1.34 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America).

In vitro biological assays

Cellular culture

Briefly, the bone marrow cells of the femurs of both animal paws were separated according to the experimental groups, isolated and inserted into 250 mL and 75 cm² cell culture flasks (TPP, Biosystems, Curitiba, PR, Brazil) with alpha MEM minimum essential culture medium (Gibco® - Life Technologies, Baltimore, United States) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas, Brazil) and gentamicin (500 μg / mL) (Gibco® - Life Technologies, Baltimore, United States).

They were subsequently incubated in a greenhouse at 37 ° C, with atmospheric humidity containing 5% CO₂. Mesenchymal cells were selected for adherence to polystyrene and expanded until they reached confluence for subsequent cell plating. Initially the culture vial medium was aspirated, discarded and the cells were washed with PBS and 3 mL of 0.25% trypsin solution (Cultilab Ltda, Campinas, Brazil) added to the vial. Then the trypsin was neutralized with 6 mL of MEM alpha medium and the pool was transferred to a 15 mL Falcon tube (TTP, Biosystems, Curitiba, Brazil). After centrifugation at 5000 rpm for 5 minutes at 25 ° C (Labnet-HERMLE Z 300K Centrifuge, NJ, United States), pellet formation was observed. The supernatant was discarded and cells were resuspended in alpha MEM medium and distributed to the wells of the 24-well plates. Cell plating was performed at approximately 20,000 cells / well, and cells were counted using the Countess® automatic counter (Invitrogen®, Baltimore, United States). The osteogenic plaque culture medium (5mg / mL ascorbic acid (Neon®, Neon Comercial, Suzano, SP, Brazil) and 2.16g beta glycerophosphate (Sigma-Aldrich® ref 50020, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was changed every two days and the development of the Cells were evaluated by reverse phase microscopy (Carl Zeiss® Microlimaging GmbH - Axiovert 40C, Germany).

Cell proliferation assessment

Briefly, for the evaluation of cell proliferation capacity, mesenchymal stem cells were cultured in the plate wells (n = 5 for each experimental group) for 24 hours. After this period, the culture medium was aspirated and the samples washed with PBS (Gibco® - Life Technologies, Baltimore, United States) and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes. The samples received the DAPI dye (Fluorshield with DAPI - Sigma Aldrich®) and incubated at room temperature for 5 minutes. 10 fields from each group were randomly captured using the Axio HBO® 100 microscope (Carl Zeiss® Microlimaging GmbH - Axiovert 40C, Germany) with a 20-fold magnification and the nuclei present on the samples were quantified using Image J software version 6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States).

Cell viability assessment

Briefly, after 7 days of cell culture a quantitative assessment of living cells was performed following exposure to the toxic agent by incubation with the MTT [3-(4,5-dimethylthio)zotro bromide] dye (Sigma Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and spectrophotometric analysis of the incorporated dye. Aliquots of 0.5 mg / mL MTT in PBS were prepared, and the primary cultures were then incubated with this solution for 4 hours at 37 ° C in a 5% CO₂ oven. After this, the MTT solution was removed and 500 µL of the DMSO (Dimethyl Sulfoxide Gibco® - Life Technologies, Baltimore, United States) solution was added to the wells for 10 minutes in a 37°C and CO₂ oven. Then the plate was stirred for 10 minutes for complete solubilization of the precipitate formed. The aliquots were removed from the wells and transferred to a 96-well plate (Greiner CELLSTAR®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for colorimetric measurement on a 570 nm wavelength microplate reader (Biotek® EL808IU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, United States).

Total protein content

Total protein content was calculated after 10 days of culture according to Lowry et al. (1951). After removal of the culture medium, the wells were washed three times with PBS at 37 ° C and filled with 2 mL of 0.1% sodium lauryl sulfate (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to protein extraction. After 30 minutes, 1 mL of the solution from each well was mixed with 1 mL of Lowry's solution (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and left for 20 minutes at room temperature. Then 1 mL of Folin and Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was added to the mixture for 30 minutes at room temperature. The absorbance was then measured at 680 nm on a spectrophotometer (Micronal® AJX 1900, Micronal, SA, Sao Paulo, Brazil) and the total protein content was calculated from a standard curve determined by bovine albumin and expressed as µg / mL.

Alkaline phosphatase activity

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

Mineralization nodules formation and quantification

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

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

microplate reader (Biotek - EL808IU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, United States) under a wavelength of 405 nm.

Statistical analysis

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

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

RESULTS

Biomechanical Analysis

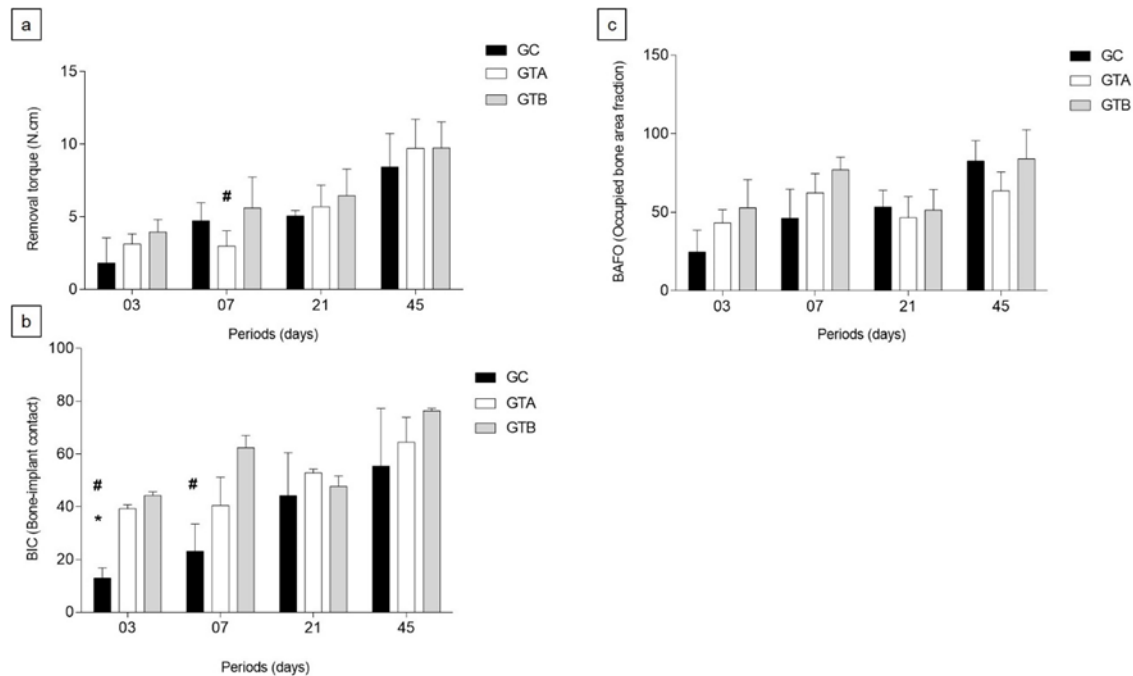
The evaluation of implant removal torque revealed that in the intergroup analysis GTB obtained statistically significant results compared to GTA at 7 days (GTB x GTA, $p = 0.029$). In the other periods, there were no differences between the groups (Figure 1, a).

Histomorphometric analysis

The evaluation results of histomorphometric analysis are disclosed by the following graphs (Figures 1, b and c). In the intergroup evaluation of the linear extension of bone-implant contact (BIC) data revealed that in 03 days there was a greater amount of bone in contact with the implant in GTA and GTB groups compared to CG ($p = 0.044$ and 0.017 , respectively). At 07 days, the GTB presented higher BIC compared to the control group ($p = 0.017$). In the other periods there were no intergroup differences for this parameter. In the intergroup evaluation of the area of turn bone fraction (BAFO) it was found that there were no statistically significant

differences in any of the periods evaluated.

Figure 1 – Biomechanical analysis



Three-dimensional radiographic evaluation (microCT)

Bone volume percentage

After reconstruction and reorientation of the images, it was possible to evaluate the percentage of bone volume in each experimental group. The data obtained revealed that there was a statistically significant difference in the intergroup comparison for all periods, and that the GTB presented a higher percentage of bone volume compared to the CG in 03 days ($p = 0.0002$); at 7 days comparing GC ($p = 0.0002$) and GTA ($p < 0.0001$), and at 21 days comparing GC ($p = 0.0079$) and GTA ($p = 0.0002$). At 45 days the statistical difference was between test groups A and B ($p = 0.0241$), where again the GTB presented a higher percentage of bone volume (Figure 2, a).

Trabecular Bone Thickness

In the evaluation of trabecular thickness the data revealed that the CG presented statistically significant differences between the test groups in all periods. GTA

presented greater trabecular thickness than GTB only in 03 days ($p < 0.0001$) (Figure 2, b).

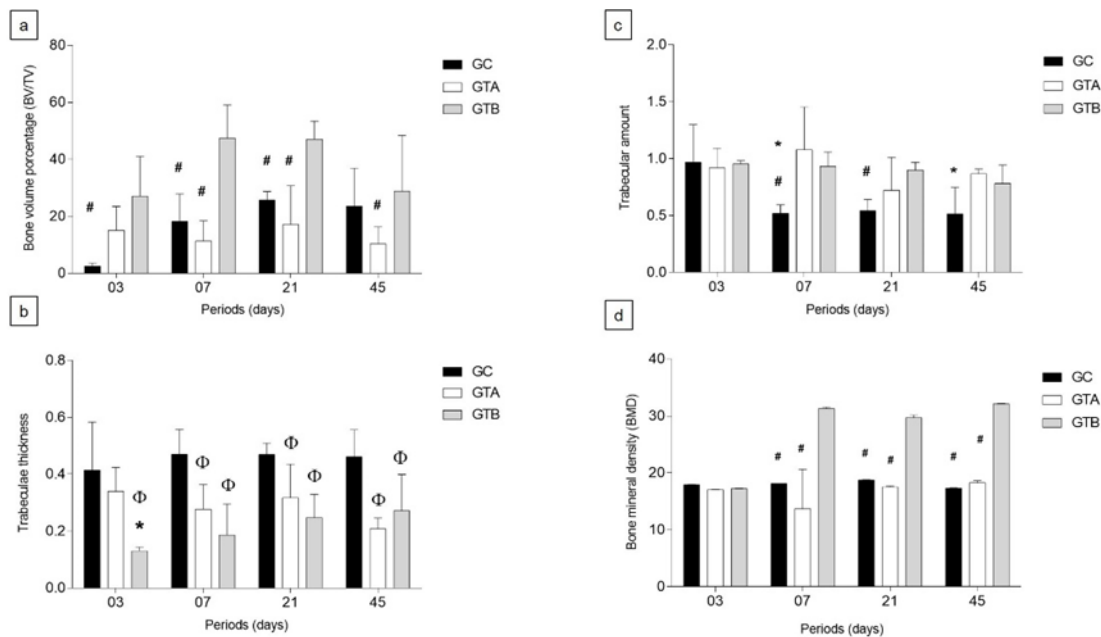
Number of trabeculae

In the evaluation of the number of trabeculae, the data revealed that the GTA ($p = 0.0002$) and GTB ($p = 0.0058$) groups presented larger number of trabeculae compared to the control group CG at 07 days. At 21 days, GTB presented higher number of trabeculae compared to CG ($p = 0.0197$) and at 45 days, GTA had better results compared to CG ($p = 0.0212$) (Figure 2, c).

Bone mineral density

In the evaluation of bone mineral density (BMD) the data revealed that for the periods of 07, 21 and 45 days the GTB presented higher BMD compared to the groups GC and GTA with $p < 0.0001$, in both groups, in the period of 07 days. . Similarly, it was observed at 21 days, when comparing the groups GC ($p = 0.0004$) and GTA ($p = 0.0002$), and at 45 days with $p < 0.0001$, for both GC and GTA. In the period of 03 days there were no statistically significant differences between the groups (Figure 2, d).

Figure 2 - Three-dimensional radiographic evaluation



In vitro assays evaluation

Cell Proliferation evaluation

Data from cell proliferation evaluation through cell vitality by DNA staining by DAPI dye revealed that, in intergroup comparison, the largest number of stained nuclei can be observed in GTA when compared to GC ($p < 0.0001$) and GTB. ($p = 0.0033$) in 03 days; as in 45 days, GC ($p = 0.0030$) and GTB ($p = 0.0033$). The GTB group had higher expression of stained nuclei compared to CG ($p = 0.0014$) at 03 days and at 21 days compared to GC ($p = 0.0033$) and GTA ($p = 0.0034$) (Figure 3, a).

Cell viability assessment

Data analysis revealed that at 03 days there was no statistically significant difference between the three groups for the evaluated condition. However, when comparing treatment groups, GTB showed the highest number of viable cells after MTT exposure compared to GTA ($p < 0.0001$) at 07 days and ($p = 0.0032$) at 45 days (Figure 3, b).

Total Protein content

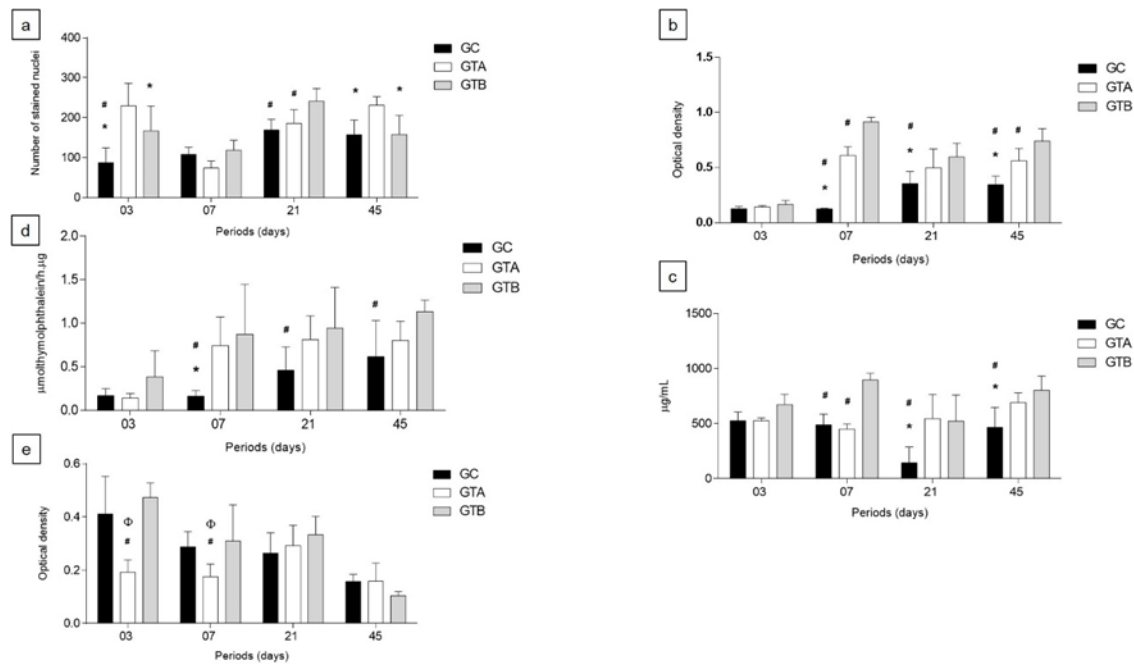
The data obtained from the total protein content analysis showed that the GTB group presented a higher amount compared to GTA ($p < 0.0001$), at 07 days, and compared to the CG at periods of 07, 21 ($p < 0.0001$) and in 45 days ($p = 0.0001$) (Figure 3, c).

Alkaline Phosphatase activity

The data obtained from the analysis of alkaline phosphatase activity revealed that the GTB group expressed higher amount of alkaline phosphatase compared to the CG in the 7 days ($p = 0.0005$), 21 days ($p = 0.0229$) and 45 days ($p = 0.0145$). The GTA group expressed higher amount of alkaline phosphatase compared to the CG ($p = 0.0053$). However, between the groups treated with PEMF there was no statistically significant difference for alkaline phosphatase expression (Figure 3, d).

Mineralization nodules quantification

The mineralization nodules formation and quantification were evaluated and the data obtained showed that GTA expressed less mineralization nodules compared to GTB ($p < 0.0001$) and GC ($p < 0.0001$) at 03 days. This data behavior was also repeated in 07 days when GTB ($p = 0.0104$) and GC ($p = 0.0372$) expressed higher number of mineralization nodules in relation to GTA. In the other periods evaluated there were no differences between the groups (Figure 3, e).

Figure 3 - *In vitro* assays evaluation

DISCUSSION

Recently, according to Daish, et al. (2018), much research has been developed targeting the biological effects of PEMF on different parameters (waveforms, frequency and intensity), in different tissues, and in different clinical situations (Ehnert et al., 2015; Massari et al., 2019; Suryani et al., 2019), but without a consensus on the ideal parameters for their use in osseointegration. Considering the need to understand this interaction of PEMF and osseointegration, the present study evaluated the hypothesis that adjuvant use of PEMF would optimize the osseointegration process of titanium implants through biomechanical, microtomographic, histomorphometric and *in vitro* biological assays. For this, we considered the 15 Hz frequency and ± 1 mT parameters for the electromagnetic field strength, which are trends evidenced in the literature responsible for the increase of *in vitro* osteogenic differentiation (Schwartz et al., 2008; Jansen et al., 2010; Kaivosoja et al., 2015; Ross et al., 2015; Galli, et al., 2018). The biomechanical results with the removal torque, which represents the force necessary to completely detach the titanium implant from the bone tissue, demonstrated that there was

superiority in the intergroup statistical analysis for the group of shorter PEMF exposure time (GTB) than was exposed for a longer time to PEMF (GTA) at 7 days, with higher removal torque values during this period. Animal studies demonstrate that statistical differences in removal torque occur at early osseointegration periods, corroborating the results of this work (Omar et al., 2011; Wennerberg, Albrektsson, 2009). Although this analysis is an indirect way to observe osseointegration, it has been suggested to be a valid measure for this assessment (de Molon et al., 2013).

In the evaluation of the data from the histomorphometric analysis, the BIC and BAFO parameters were used, which are well established measures in the literature for osseointegration evaluation. The results of the present study revealed that for the linear extension of bone in contact with the implant (BIC), there was no difference between the groups exposed to PEMF. However, these groups were superior to the control and higher BIC was observed in the comparison of GTB and the control in the early periods of bone healing. These results are in agreement with the study by Jing et al., 2016, in which the application of PEMF (15 Hz and 2 mT) promoted higher values for BIC and for the turn bone fraction (BAFO) compared to the group control. However, although PEMF promotes a higher amount of BAFO compared to control in the early periods, the results of the present study revealed no statistical differences between the experimental groups. With the application of the 10 Hz (0.2 and 0.4 mT) PEMF, the group from Barak et al., 2016 showed an increase in BIC only in 14 days of evaluation different from our study where, from the third day, it was already possible to notice the increase of this parameter in the exposed groups compared to the control. Comparing the results of the studies by Matsumoto et al., 2000, Özen et al., 2004 and Akca et al., 2007 (100 Hz, 4 hours daily and 0.2 mT), it is noted that after 14 days of PEMF there is an increase BIC and BAFO compared to control, and the results for bone-implant contact are similar to those found in the present study. One of the possible reasons for this difference in BIC and BAFO would be the inability of the clot to fill the entire healing area, that is, the space between the recipient bed bone wall and the implant turns. As a consequence, there is a compromised bone formation near the implant center (Beutel et al., 2016). This factor may be due to the drilling protocol which, according to Baies-Campos et al., 2015, results in different biological responses with higher BIC and BAFO values for intermediate drilling (Soares et al., 2015). In addition,

implant design, healing area dimensions and bone type, according to Soares et al., 2015, also influence the osseointegration process of the implant resulting in different biological responses that affect histomorphometric measurements. Three-dimensional radiographic evaluation by computed microtomography (Micro-CT) allows the analysis of bone tissue morphological parameters after exposure to a given treatment, indirectly representing tissue health status (Bouxsein et al., 2010; Soares et al., 2015). The results of this analysis revealed that, among the groups evaluated, the shortest time of exposure to PEMF promoted the highest proportion of bone volume / total volume (BV / TV) in all periods analyzed. This finding is controversial to those of Ibiwoye et al., 2004, where the application of PEMF (15 Hz, 2 mT 3 hours daily) promoted a subtle increase in bone volume compared to control. However, in relation to trabecular thickness (Tb.Th) the 3-hour exposure group showed better results at 03 days and, in the evaluation of the number of trabeculae (Tb.N) there was no difference between the groups exposed to PEMF in the periods. These findings corroborate the study by Jing et al., 2016 in which with the use of PEMF (15 Hz and 2 mT) observed significant improvement in bone architecture parameters compared to the control group. Despite using different PEMF parameters, Akca et al., 2007, in a study with titanium implants inserted into tibias of ovariectomized animals, found that 50 Hz and 0.2 mT PEMF for 4 hours daily also promoted higher bone volume rates. Corroborating the present study, however, contrary to our findings, they noticed an increase in the number of bone trabeculae. Regarding bone mineral density (BMD), the shorter exposure time to PEMF promoted higher values than the GTA and control groups, just as in the study by Luo et al., 2005, where 1 mT PEMF promoted better effects on BMD and bone structural integrity compared to 2 mT PEMF intensity (Suryani et al., 2019). With similar results, Shen, Zhao, 2010 showed that the application of PEMF (15 Hz, 0.8 mT) promoted higher BMD compared to control. However, there is a tendency in the literature that the 15 Hz and 1 mT parameters promote an increase in osteogenic differentiation *in vitro* (Ross et al., 2015). The phenomena observed *in vivo* can be elucidated by *in vitro* analysis of cellular behavior after exposure to PEMF. Mesenchymal cells remain in an undifferentiated stage until they receive appropriate activation signals and begin the process of differentiation into specific strains according to the type of stimulus received (Jazayeri et al., 2017) and the application

of a biophysical stimulus assists in this process (Galli, et al.). This finding can also be observed by Bagheri et al., 2016 in which the role of PEMF occurs in osteogenic differentiation of mesenchymal cells, assisting in different cellular stages, providing an increase in cell proliferation. Considering the findings of these authors, in the present study a significant increase in cell proliferation was also observed in the groups exposed to PEMF in relation to the control in the initial evaluation period. The results found by Chang, Chen, Sun, Lin, 2004 and Wang et al., 2014 with 15 Hz and 0.1 mT and 0.9 mT of PEMF, respectively, also corroborate this study, but we also noticed the same behavior in the late periods, unlike of the findings by Diniz, et al. in cell culture with 15 Hz and 7 mT PEMF. According to Zhai et al., 2016, osteoblastic proliferation is a critical indicator for the activities of these cells because, from this event, there is increased cellular differentiation and mineralization. Thus, the results of other *in vitro* analyzes performed in this study are in accordance with the literature, as will be seen below. In the evaluation of cell viability after exposure to MTT, the exposed groups presented a higher amount of viable osteoblasts compared to the control, however, in the initial and final stages, the shorter exposure time showed superiority over the longer time of PEMF. According to Daish, et al., the application of PEMF significantly influences osteogenesis by increasing gene expression, bone matrix deposition, cell proliferation and differentiation of these cells, as observed in our study. In addition, there is also the production of alkaline phosphatase, an important extracellular protein that marks osteoblastic differentiation. Detection of this exoenzyme is initially expressed in early periods of mineralization induction and can be used as a precedent marker of osteogenesis (Mornet et al., 2001; Douglas et al., 2012). According to Chen et al., 2019, as the time to induce cell proliferation increases and osteogenic differentiation of cells progresses, ALP activity gradually increases. Our results revealed that the quantification of alkaline phosphatase (ALP) was higher in the groups exposed to PEMF compared to control since the initial evaluation periods, corroborating the literature (Chang, et al.; Emes et al., 2013; Ross et al., 2015; Daish, et al.), however, no difference was observed in the expressed amount of this protein between exposure times. In contrast, the study by Chang, et al., showed that ALP activity was lower after exposure to PEMF, although they found increased proliferation and cell viability. Also according to the authors, for the 15 Hz and 0.1 mT PEMF parameters

the effect was restricted to proliferation and did not cause cell differentiation. The final stage after osteoblast cell differentiation is mineralization of the extracellular matrix. According to Chen et al., 2019, the differentiation capacity of these cells can be identified from the deposition of calcium salt in the cell matrix by staining with alizarin red. Alteration of calcium salt levels is a marker of bone cell proliferation and differentiation and osteogenic potential of bone tissue. Thus, our results regarding the quantification of mineralization nodules were statistically higher in the early periods, in the group with shorter exposure time and according to Ross et al., 2015. These results suggest that shorter exposure time to PEMF may promote better osseointegration response of implants. Although it is difficult to compare all parameters evaluated between the protocols of the different studies due to the variability of the models used in the PEMF generating different results (De Haas, Lazarovici, Morrison, 1979), it is generally noted that the use of This therapy adjunct improves the evaluation measures available for osseointegration both in vitro and in vivo compared to control (Naito et al., 2019). According to Wang et al., 2014, the reason for this discrepancy in the literature is the different cell phenotypes used, the different frequencies and intensities of PEMF and the different experimental periods selected for analysis. Moreover, the authors point out that while controversy remains about the exact effects on osteoblast function, the consensus is that the adjunctive application of PEMF exerts a reproducible osteogenic effect. A limiting factor for the use of this technique is that, in most studies in the literature, (Matsumoto et al., 2000; Fini et al., 2004; Akca et al., 2007; Schwartz et al., 2008; Kaivosoja, Sariola, Chen, Konttinen, 2015; Zhai et al., 2016; Jazayeri et al., 2017; Tong et al., 2017; Waldorff, et al.; He, et al.) the application of PEMF occurs during extended stimulation periods, that in the context of adjunct implant therapy, it could make it difficult for patients to adhere to the technique, regardless of the dose administered (Akca et al., 2007). Clinical studies with commercially available devices have revealed that despite successful results, they operate under the same properties for each patient, regardless of different biotypes, region morphology, or fracture location (Daish, et al.). Based on PEMF parameters considered appropriate for the target tissue, the present study aimed at optimizing bone healing in preclinical trials, achieving satisfactory results that, within the limitations of the technique and the study model, contribute to the validation of the use from adjunct therapy to implant

placement, as well as favoring further research to better understand the mechanisms of action in bone repair.

Considering the limitations of the present study, the application of the pulsed electromagnetic field as a biostimulator was effective in optimizing the events in bone tissue that cause osseointegration, especially when applied for a shorter time and in the initial periods of bone healing.

REFERENCES

1. Akca K, Sarac E, Baysal U, Fanuscu M, Chang T-L, Cehreli M. Micro-morphologic changes around biophysically stimulated titanium implants in ovariectomized rats. *Head Face Med*. 2007 Jul 16;3:2B. PMID: 17634134.
2. Androjna C, Fort B, Zborowski M, Midura RJ. Pulsed electromagnetic field treatment enhances healing callus biomechanical properties in an animal model of osteoporotic fracture. *Bioelectromagnetics*. 2014 Sep;35(6):396-405. doi:10.1002/bem.21855. PubMed PMID: 24764277.
3. Bagheri L, Pellati A, Rizzo P, Aquila G, Massari L, De Mattei M, Ongaro A. Notch pathway is active during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells induced by pulsed electromagnetic fields. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Feb;12(2):304-315. doi: 10.1002/term.2455. Epub 2017 Jul 28. PubMed PMID: 28482141.
4. Baires-Campos FE, Jimbo R, Bonfante EA, Fonseca-Oliveira MT, Moura C, Zanetta-Barbosa D, et al. Drilling dimension effects in early stages of osseointegration and implant stability in a canine model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2015;20:471-479.
5. Barak S, Neuman M, Iezzi G, Piatelli A, Perrotti V, Gabet Y. A new device for improving dental implants anchorage: a histological and micro-computed tomography study in the rabbit. *Clin Oral Impl Res*. 2016 Aug; 27(8):935-42. doi:10.1111/clr.12661. PubMed PMID: 26249830.
6. Bassett, C.A., Pawluk, R.J., Pilla, A.A.,. Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields. A surgically noninvasive method. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1974. 238, 242–262)
7. Beutel BG, Danna NR, Granato R, Bonfante EA, Marin C, Tovar N, Suzuki M,

Coelho PG. Implant design and its effects on osseointegration over time within cortical and trabecular bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Aug;104(6):1091-7. doi: 10.1002/jbm.b.33463

8. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. Review. PubMed PMID: 20533309.

9. Buzzá EP, Shibli JA, Barbeiro RH, Barbosa JR. Effects of electromagnetic field on bone healing around commercially pure titanium surface: histologic and mechanical study in rabbits. *Impl Dent*. 2003;12(2):182-7. PubMed PMID:12861888.

10. Chang WH, Chen LH, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*. 2004 Sep;25(6):457–65. PubMed PMID: 15300732.

11. Chen X, Chen Y, Hou Y, Song P, Zhou M, Nie M, Liu X. Modulation of proliferation and differentiation of gingiva-derived mesenchymal stem cells by concentrated growth factors: Potential implications in tissue engineering for dental regeneration and repair. *Int J Mol Med*. 2019 Jul;44(1):37-46. doi: 10.3892/ijmm.2019.4172.

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

13. De Haas WG, Lazarovici MA, Morrison DM. The effect of low frequency magnetic fields on the healing of the osteotomized rabbit radius. *Clin Orthop Relat Res*. 1979 Nov-Dec;(145):245-51. PubMed PMID: 317036.

14. de Molon RS, Najarro JA, Morais-Camillo D, Verzola MHA, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio Jr E. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin. Oral Impl. Res*. 2013 Jul;24(7):831–7 doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02467.x. PubMed PMID: 22509797.

15. Dimitrou R, Babis GC. Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007 Jul-Sep;7(3):253-65. Review. PubMed PMID: 17947809.

16. Diniz P., Shomura K., Soejima K., Ito G.. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics*. 2002, (23), pp. 398-405.
17. Douglas TE, Messersmith PB, Chasan S, Mikos AG, de Mulder EL, Dickson G, Schaubroeck D, Balcaen L, Vanhaecke F, Dubruel P, Jansen JA, Leeuwenburgh SC. Enzymatic mineralization of hydrogels for bone tissue engineering by incorporation of alkaline phosphatase. *Macromol Biosci*. 2012 Aug;12(8):1077-89. doi: 10.1002/mabi.201100501. Epub 2012 May 30. PubMed PMID: 22648976.
18. Ehnert S, Falldorf K, Fentz AK, Ziegler P, Schröter S, Freude T, Ochs BG, Stacke C, Ronniger M, Sachtleben J, Nussler AK. Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure - Clinical implication possible. *Bone Rep*. 2015 Aug 18;3:48-56. doi: 10.1016/j.bonr.2015.08.002. eCollection 2015 Dec. PubMed PMID: 28377966.
19. Elias CN, Meirelles L. Improving osseointegration of dental implants. *Expert Rev Med Devices*. 2010 Mar;7(2):241-56. doi: 10.1586/erd.09.74.
20. Emes Y, Akça K, Aybar B, Yalçın S, Çavuşoğlu Y, Baysal U, İşsever H, Atalay B, Vural P, Ergüven M, Çehreli MC, Bilir A. Low-level laser therapy vs. Pulsed electromagnetic field on neonatal rat calvarial osteoblast-like cells. *Lasers Med Sci*. 2013 May;28(3):901-9. doi: 10.1007/s10103-012-1165-5.
21. Fadly M, Selim H, Katamish M, Metwally S. Evaluation of the effect of pulsed electromagnetic fields on osseointegration of immediate dental implants. *Egypt J Oral Maxillofac Surg*. 2014 5. 84-91. doi: 10.1097/01.OMX.0000451843.25418.e1.
22. Ferroni L, Tocco I, De Pieri A, Menarin M, Fermi E, Piattelli A, Gardin C, Zavan B. Pulsed magnetic therapy increases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells only if they are pre-committed. *Life Sci*. 2016 May 1;152:44-51. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.020.
23. Fini M, Cadossi R, Cane V, Cavani F, Giavaresi G, Krajewski A, Martini L, Aldini NN, Ravaglioli A, Rimondini L, Torricelli P, Giardino R. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osseointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. *J Orthop Res*. 2002 Jul; 20(4):756-63. PubMed PMID: 12168664.

24. Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan* 1957;12:1158-62)
25. Funk RH. Coupling of pulsed electromagnetic fields (PEMF) therapy to molecular grounds of the cell. *Am J Transl Res.* 2018 May 15;10(5):1260-1272. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 29887943.
26. 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. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 30254677.
27. Gherardini L, Ciuti G, Tognarelli S, Cinti C. Searching for the perfect wave: the effect of radiofrequency electromagnetic fields on cells, *Int. J. Mol. Sci.* 2014 (15) 5366–5387
28. Han Y, Xu K. Photoexcited formation of bone apatite-like coatings on micro-arc oxidized titanium. *J Biomed Mater Res.* 2004; 71:608–614
29. Hastings GW, Mahmud FA. Electrical effects in bone. *J Biomed Eng.* 1988 Nov;10(6):515-21. Review. PubMed PMID: 3070168.
30. 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. PubMed PMID: 28965919.
31. Hofmann AA, Bloebaum RD, Bachus KN. Progression of human bone ingrowth into porous-coated implants. Rate of bone ingrowth in humans. *Acta Orthop Scand* 1997; 68: 161-6.
32. Hong JM, Kang KS, Yi HG, Kim SY, Cho DW,. Electromagnetically controllable osteoclast activity. *Bone.* 2014,62, 99–107
33. Ibiwoye MO, Powell KA, Grabiner MD, Patterson TE, Sakai Y, Zborowski M, Wolfman A, Midura RJ. Bone mass is preserved in a critical-sized osteotomy by low energy pulsed electromagnetic fields as quantitated by in vivo micro-computed tomography. *J Orthop Res.* 2004 Sep;22(5):1086-93. PubMed PMID: 15304283.
34. Jansen JH, van der Jagt OP, Punt BJ, Verhaar JA, van Leeuwen JP, Weinans H,et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study. *BMC Musculoskelet Disord.*2010 Aug 23;11:188. doi: 10.1186/1471-2474-11-188. PubMed PMID:

20731873.

35. Jazayeri M, Shokrgozar MA, Haghhighipour N, Bolouri B, Mirahmadi F, Farokhi M. Effects of Electromagnetic Stimulation on Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells and Repair of Bone Lesions. *Cell J*. 2017 Apr-Jun;19(1):34-44. Epub 2016 Dec 21. PubMed PMID: 28367415.

36. Jing D, Zhai M, Tong S, Xu F, Cai J, Shen G, Wu Y, Li X, Xie K, Liu J, Xu Q, Luo E. Pulsed electromagnetic fields promote osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in bone defect repair through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Sci Rep*. 2016 Aug 24;6:32045. doi:10.1038/srep32045. PMID: 27555216.

37. Kaivosoja E, Sariola V, Chen Y, Kontinen YT. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Jan;9(1):31-40. doi: 10.1002/term.1612. Epub 2012 Oct 5. PubMed PMID: 23038647.

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

39. Leesungbok R, Ahn SJ, Lee SW, Park GH, Kang JS, Choi JJ. The Effects of a static magnetic field on bone formation around a sandblasted, large-grit, acid-etched-treated titanium implant. *J Oral Implantol*.2013 39:S1, 248-255. doi: doi:10.1563/AAID-JOI-D-11-00101.

41. Luo E, Jiao L, Shen G, Wu XM, Xu Q, Lu L. Effects of the PEMFs of different intensity on BMD and biomechanical properties of rabbits' femur. 2005 Dec;22(6):1168-70. PubMed PMID: 16422091.

42. 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. Review. PubMed PMID: 30645684.

43. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants insert into the

femur of rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2000. 2000 Aug; 11(4):345-60. PubMed PMID: 11168228.

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

45. Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJ. Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Mar-Apr;24(2):205-15. PubMed PMID: 19492635.

47. 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. PubMed PMID: 15936919.

48. Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Ménez A, Le Du MH. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem*. 2001 Aug 17;276(33):31171-8. Epub 2001 Jun 6. PubMed PMID: 11395499.

49. Naito Y, Yamada S, Jinno Y, Arai K, Galli S, Ichikawa T, Jimbo R. Bone-forming effect of a static magnetic field in rabbit femurs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2019 Mar/Apr;39(2):259-264. doi: 10.11607/prd.3220. PubMed PMID: 30794262.

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

51. Noriega-Luna B, Sabanero M, Sosa M, Aliva-Rodriguez M. Influence of pulsed magnetic fields on the morphology of bone cells in early stages of growth. *Micron*. 2011 Aug; 42(6): 600-7. doi: 10.1016/j.micron.2011.02.005. PubMed PMID:21474322.

52. Omar OM, Lennerås ME, Suska F, Emanuelsson L, Hall JM, Palmquist A, Thomsen P. The correlation between gene expression of proinflammatory markers and bone formation during osseointegration with titanium implants. *Biomaterials*. 2011 Jan;32(2):374-86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.011. PubMed PMID:

20933278.

53. Özen J, Atay A, Oruç S, Dalkiz M, Beydemir B, Develi S. Evaluation of pulsed electromagnetic fields on bone healing after implant placement in the rabbit mandibular model. *Turk J Med Sci.* 2004 34(2):91–95.

54. Parekh AB. Decoding cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Trends Biochem Sci.* 2011 Feb;36(2):78-87. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.013. Epub 2010 Aug 31. Review. PubMed PMID: 20810284.

55. 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. Review. PubMed PMID: 26042793.

56. Rubin CT, McLeod KJ. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis.* Academic press, 1996. p.351-71

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

58. Seeliger, C., Falldorf, K., Sachtleben, J., Griensven, M. Low-frequency pulsed electromagnetic fields significantly improve time of closure and proliferation of human tendon fibroblasts. *Eur. J. Med. Res.* 2014, (19) 37

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

60. Shayesteh YS, Eslami B, Dehghan MM, Vaziri H, Alikhassi M, Mangoli A, Khojasteh A. The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. *J Prosthodont.* 2007 Sep-Oct;16(5): 337-42. PubMed PMID: 17559534.

61. Shen WW, Zhao JH. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects BMD and local factor production of rats with disuse osteoporosis. *Bioelectromagnetics.* 2010 Feb;31(2):113-9. doi: 10.1002/bem.20535. PubMed PMID: 19670410.

62. Soares PB, Moura CC, Claudino M, Carvalho VF, Rocha FS, Zanetta-Barbosa D. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration: A Histomorphometric and Implant Stability Study in Rabbits. *Braz Dent J.* 2015 Oct;26(5):451-7. doi: 10.1590/0103-6440201300411.
63. Suryani L, Too JH, Hassanbhai AM, Wen F, Lin DJ, Yu N, Teoh SH. Effects of Electromagnetic Field on Proliferation, Differentiation, and Mineralization of MC3T3 Cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019 Feb;25(2):114-125. doi:10.1089/ten.TEC.2018.0364. PubMed PMID: 30661463.
64. Tong J, Sun L, Zhu B, Fan Y, Ma X, Yu L, Zhang J. Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients. *Bioelectromagnetics.* 2017 Oct;38(7):541-549. doi: 10.1002/bem.22076. Epub 2017 Aug 18. PubMed PMID: 28833306.
65. Tucker JJ, Cirone JM, Morris TR, Nuss CA, Huegel J, Waldorff EI, Zhang N, Ryaby JT, Soslowsky LJ. Pulsed electromagnetic field therapy improves tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model. *J Orthop Res.* 2016 Jun 10. doi: 10.1002/jor.23333. PMID: 27282093.
66. Zhai M, Jing D, Tong S, Wu Y, Wang P, Zeng Z, Shen G, Wang X, Xu Q, Luo E. Pulsed electromagnetic fields promote in vitro osteoblastogenesis through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Bioelectromagnetics.* 2016 Apr;37(3):152-162. doi: 10.1002/bem.21961. Epub 2016 Feb 18. PubMed PMID: 26891468.
67. Zhou J, Wang JQ, Ge BF, Ma XN, Ma HP, Xian CJ, Chen KM. Different electromagnetic field waveforms have different effects on proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts in vitro. *Bioelectromagnetics.* 2014, 35, 30–38
68. Waldorff EI, Zhang N, Ryaby JT. Pulsed electromagnetic field applications: A corporate perspective. *J Orthop Translat.* 2017 Mar 31;9:60-68. doi: 10.1016/j.jot.2017.02.006. eCollection 2017 Apr. Review. PubMed PMID: 29662800.
69. Wang J, An Y, Li F, 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. PubMed PMID: 24140610.
70. Wennerberg A, Albrektsson T. Structural influence from calcium phosphate coatings and its possible effect on enhanced bone integration. *Acta Odontol Scand.*

2009;67(6):333-40. doi: 10.1080/00016350903188325. Review. PubMed PMID:19722110.

71. Yoshida T, Kim WC, Kubo T. [Bone fracture and the healing mechanisms. Fracture treatment using electrical stimulation]. Clin Calcium. 2009 May;19(5):709-17.doi: CliCa0905709717. Review. PubMed PMID: 19398840.

ANEXO A —Certificado do Comitê de Ética



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

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

São José dos Campos, 10 de fevereiro de 2017


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