

Atendendo a solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta tese/dissertação
será disponibilizado somente a partir de
02/02/2024.

At the author's request, the full text of
this thesis/dissertation will not be
available until Feb 02, 2024.



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

NICOLE BERTON DE MOURA

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

2022

NICOLE BERTON DE MOURA

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

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

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

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

Coorientadora: Dra. Camila Lopes Ferreira

São José dos Campos

2022

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

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

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

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

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardimi

Coorientadora: Camila Lopes Ferreira

1. Regeneração Óssea. 2. Calota. 3. Osteogênese. 4. Campos Eletromagnéticos. 5. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico. I. Jardimi, Maria Aparecida Neves, orient. II. Ferreira, Camila Lopes, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dra. Andréa Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Dr. Marcelo Lelis Zuppardo

Universidade do vale do paraíba - UNIVAP

São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de agosto de 2022.

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Ao programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

APÊNDICES	76
ANEXO A	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

- Akca K, Sarac E, Baysal U, Fanuscu M, Chang TL, Cehreli M. Micro-morphologic changes around biophysically-stimulated titanium implants in ovariectomized rats. *Head Face Med.* 2007 Jul 16;3:28. doi: 10.1186/1746-160X-3-28. PMID: 17634134; PMCID: PMC1947957.
- Androjna C, Fort B, Zborowski M, Midura RJ. Pulsed electromagnetic field treatment enhances healing callus biomechanical properties in an animal model of osteoporotic fracture. *Bioelectromagnetics.* 2014 Sep;35(6):396-405. doi: 10.1002/bem.21855. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24764277.
- Aroni MA, Costa Neto PF, Oliveira GJ, Marcantonio RA, Marcantonio Junior E. Bone repair induced by different bone graft substitutes in critical-sized defects in rat calvaria. *Rev Odontol UNESP.* 2019;48: e20190041. doi: 10.1590/1807-2577.04119.
- Assiotis A, Sachinis NP, Chalidis BE. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. *J Orthop Surg Res.* 2012 Jun 8;7:24. doi: 10.1186/1749-799X-7-24. PMID: 22681718; PMCID: PMC3441225.
- Azan A, Gailliègue F, Mir LM, Breton M. Cell Membrane Electropulsation: Chemical Analysis of Cell Membrane Modifications and Associated Transport Mechanisms. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2017;227:59-71. doi: 10.1007/978-3-319-56895-9_4. PMID: 28980040.
- Bianchi J, Gonçalves JR, Ruellas ACO, Vimort JB, Yatabe M, Paniagua B, Hernandez P, Benavides E, Soki FN, Cevidanes LHS. Software comparison to analyze bone radiomics from high resolution CBCT scans of mandibular condyles. *Dentomaxillofac Radiol.* 2019 Sep;48(6):20190049. doi: 10.1259/dmfr.20190049. Epub 2019 May 20. PMID: 31075043; PMCID: PMC6747438.
- Biggane P, Jackson X, Nazarian A. Bone composition and healing: Open electromagnetic and biomechanical problems 2016 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). 2016;38:6026-9. doi: 10.1109/EMBC.2016.7592102.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

He Z, Selvamurugan N, Warshaw J, Partridge NC. Pulsed electromagnetic fields inhibit human osteoclast formation and gene expression via osteoblasts. *Bone*. 2018 Jan;106:194-203. doi: 10.1016/j.bone.2017.09.020. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28965919.

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

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

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

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

Jing D, Zhai M, Tong S, Xu F, Cai J, Shen G, et al. Pulsed electromagnetic fields promote osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in bone defect repair through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Sci Rep*. 2016 Aug 24;6:32045. doi: 10.1038/srep32045. PMID: 27555216; PMCID: PMC4995433.

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

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

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

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

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

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

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

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

Midura RJ, Ibiwoye MO, Powell KA, Sakai Y, Doehring T, Grabiner MD, et al. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. *J Orthop Res.* 2005 Sep;23(5):1035-46. doi: 10.1016/j.orthres.2005.03.015. PMID: 15936919.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, et al. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res*. 2015 Jul;15(1):96-108. doi: 10.1016/j.scr.2015.04.009. Epub 2015 May 12. PMID: 26042793; PMCID: PMC4516580.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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