

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

04/03/2022



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

CAMILLA MAGNONI MORETTO

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

2020

CAMILLA MAGNONI MORETTO

**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

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Magnoni Moretto, Camilla

Avaliação de diferentes protocolos de campo eletromagnético pulsado na osseointegração de implantes: estudo in vivo e in vitro. / Camilla Magnoni Moretto. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
70 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientador: Maria Aparecida Neves Jardim.

1. Osseointegração. 2. Campos eletromagnéticos. 3. Implantes osteointegrados. 4. Ratos. I. Jardim, Maria Aparecida Neves, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa Assoc Maria Aparecida Neves Jardim (Orientador)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
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” - Unesp
Faculdade de Odontologia
Campus de Araraquara

Profª Drª Luciana Saraiva

Universidade de São Paulo - USP
Faculdade de Odontologia
Campus de São Paulo

Profª Drª Andréa Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
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 - UNIARA
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. Fonte de vida e da minha inspiração. Minha gratidão pela capacitação e pela fé em um Deus de longe e, especialmente de 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 e Cahe 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
ANEXO.....	70

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 Ensaios 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
μA	Microampére
μg	Micrograma
μL	Microlitro

Moretto CM. Avaliação de diferentes protocolos de campo eletromagnético pulsado na osseointegração de implantes: estudo in vivo e in vitro [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

A utilização de estimulação biofísica através da modalidade de campo eletromagnético pulsado (CEMP) para o tratamento de diversas condições no tecido ósseo tem despertado o interesse científico há décadas. Entretanto, a grande variedade nos parâmetros e protocolos utilizados e a divergência de resultados na literatura dificultam o estabelecimento de uma metodologia que seja eficaz no contexto da terapia com implantes osseointegrados. Dessa forma, torna-se importante avaliar o efeito de diferentes tempos de aplicação do CEMP padronizado em diferentes momentos no processo de osseointegração de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos. Para isso, foram utilizados 60 animais (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), randomizados em três grupos experimentais: controle, teste A (GTA) submetidos por 3 horas de CEMP, e teste B (GTB) com 1 hora de CEMP, sendo que, a exposição ocorreu em 5 dias semanalmente durante o período experimental. Todos os animais receberam implantes em ambas as tíbias, e a aplicação do CEMP ocorreu apenas nos grupos teste com parâmetros fixos de ± 1 mT, 15 Hz, com 25 ciclos repetidos por 200 microssegundos. Após a 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, GTB apresentou melhores resultados em comparação ao GTA 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 GTA apresentou melhor desempenho na avaliação da espessura do osso trabecular em 03 dias e na proliferação celular em 03 e 45 dias comparado ao GTB. 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. Com os resultados pode-se concluir que, 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 do reparo ósseo.

Palavras-chave: Osseointegração. Campos eletromagnéticos. Implantes osseointegrados. Ratos.

Moretto 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; 2020.

ABSTRACT

The use of biophysical stimulation through the pulsed electromagnetic field modality (PEMF) for the treatment of various conditions in bone tissue has aroused scientific interest for decades. However, the wide variety of parameters and protocols used and the divergence of results in the literature make it difficult to establish a methodology that is effective in the context of therapy with osseointegrated implants. Thus, it is important to evaluate the effect of different application times of the standardized PEMF at different times in the osseointegration process of titanium implants inserted in tibiae of rats. For this, 60 animals (*Rattus norvegicus*, variation *albinus*, Wistar) were used, randomized in three experimental groups: control, test A (GTA) submitted for 3 hours of CEMP, and test B (GTB) with 1 hour of PEMF, and the exposure occurred in 5 days weekly during the trial period. All animals received implants in both tibiae, and the application of PEMF only occurred in the test groups with fixed parameters ± 1 mT, 15 Hz, with 25 cycles repeated for 200 microseconds. After euthanasia, the pieces were separated and prepared for mechanical testing, histomorphometric analysis, computed microtomography (μ CT) and in vitro biological tests. Data were tabulated and ANOVA analysis of variance was applied, with a significance level of 5%. The results obtained revealed that, GTB presented better results in comparison to GTA in the removal torque tests in 07 days; in bone volume and bone mineral density, both at 07, 21 and 45 days; cell proliferation in 21 days, cell viability in 07 and 45 days, total protein content in 07 days and mineralization nodules in 03 and 07 days. GTA performed better in assessing trabecular bone thickness in 03 days and in cell proliferation in 03 and 45 days compared to GTB. The test groups showed results superior to the control in assessments of bone-implant contact, trabecular bone thickness, in cell viability, total protein content and alkaline phosphatase. In the histomorphometric analysis and in the number of trabeculae, there were no differences between the test groups. With the results it can be concluded that the application of the pulsed electromagnetic field as a biostimulator was effective in the optimization of the events in the bone tissue that result in osseointegration, especially when applied for a shorter time and in the initial periods of bone repair.

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; El 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; El 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.

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;20:471-9.

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

* 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, et al. 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, et al. 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):525-42. 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, et al. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin. Oral Impl Res*. 2013 Jul;24(7):831–7 doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02467.x. PubMed PMID: 22509797.

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, Devencioglu 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, et al. 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, et al. Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure - Clinical implication possible. *Bone Rep*. 2015 Aug 18;3:48-56. doi: 10.1016/j.bonr.2015.08.002. eCollection 2015 Dec. PubMed PMID: 28377966.

Emes Y, Akça K, Aybar B, Yalçın S, Çavuşoğlu Y, Baysal U, et al. 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.

El Fadly MA, Selim HA, Katamish MA, Metwally SA. Evaluation of the effect of pulsed electromagnetic fields on osseointegration of immediate dental implants. *Egypt J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Oct;5(3):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, et al. 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, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osseointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. *J Orthop Res*. 2002 Jul; 20(4):756-63. PubMed PMID: 12168664.

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.

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

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.

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

doi:10.1371/journal.pone.0079377. 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 May;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, 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. 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, et al. 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, et al. 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, Doebling T, Grabner MD, et al. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. *J Orthop Res*. 2005 Sep;23(5):1035-46. PubMed PMID: 15936919.

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, et al. Bone-forming effect of a static magnetic field in rabbit femurs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2019 Mar/Apr;39(2):259-64. doi: 10.11607/prd.3220. PubMed PMID: 30794262.

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, et al. 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):91–5.

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, Arinzech 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, et al. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res.* 2015 Jul;15(1):96-108. doi: 10.1016/j.scr.2015.04.009. Epub 2015 May 12. Review. PubMed PMID: 26042793.

Scardueli, CR. Utilização sistêmica de estrôncio não radioativo como potencializador da osseointegração de implantes: avaliação biomeânica, 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, et al. The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. *J Prosthodont.* 2007 Sep-Oct;16(5): 337-42. PubMed PMID: 17559534.

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, et al. Effects of Electromagnetic Field on Proliferation, Differentiation, and Mineralization of MC3T3 Cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019 Feb;25(2):114-25. doi:10.1089/ten.TEC.2018.0364. PubMed PMID: 30661463.

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, et al. Pulsed electromagnetic fields promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by reinforcing intracellular calcium transients. *Bioelectromagnetics*. 2017 Oct;38(7):541-49. doi: 10.1002/bem.22076. Epub 2017 Aug 18. PubMed PMID: 28833306.

Tucker JJ, Cirone JM, Morris TR, Nuss CA, Huegel J, Waldorff EI, et al. Pulsed electromagnetic field therapy improves tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model. *J Orthop Res*. 2017 Apr;35(4):902-9. doi: 10.1002/jor.23333. Epub 2016 Jun 22. PubMed 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, et al. Pulsed electromagnetic fields promote in vitro osteoblastogenesis through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Bioelectromagnetics*. 2016 Apr;37(3):152-62. doi: 10.1002/bem.21961. Epub 2016 Feb 18. PubMed PMID: 26891468.

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

Waldorff EI, Zhang N, Ryaby JT. Pulsed electromagnetic field applications: A corporate perspective. *J Orthop Translat*. 2017 Mar 31;9:60-8. 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.