



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA



Guilherme Silva Furtado

**Atividade osteoindutora da fotobiomodulação nos comprimentos de onda
vermelho e infravermelho em modelo ex vivo de remodelação óssea**

SÃO LUÍS

2023

Guilherme Silva Furtado

**Atividade osteoindutora da fotobiomodulação nos comprimentos de onda
vermelho e infravermelho em modelo ex vivo de remodelação óssea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Dias
Neves Lago

SÃO LUÍS

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Silva Furtado, Guilherme.

Atividade osteoindutora da fotobiomodulação nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho em modelo ex vivo de remodelação óssea / Guilherme Silva Furtado. - 2023.

79 f.

Orientador(a): Andréa Dias Neves Lago.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Odontologia/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. Fotobiomodulação. 2. Laser infravermelho. 3. Laser vermelho. 4. Modelo ex vivo. 5. Remodelação óssea.
I. Dias Neves Lago, Andréa. II. Título.

GUILHERME SILVA FURTADO

Atividade osteoindutora da fotobiomodulação nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho em modelo ex vivo de remodelação óssea

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Odontologia em sessão pública realizada no dia 27/12/2023, considerou:

() APROVADO

() REPROVADO

- 1) Examinador: Prof^a. Dr^a. Rosana Costa Casanovas
- 2) Examinador: Prof^a. Dr^a. Marcia Cristina Dias de Moraes
- 3) Examinador suplente: Prof^a. Dr^a. Daniele Meira Conde Marques
- 4) Examinador suplente: Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Nogueira Rodrigues
- 5) Presidente (Orientador): Prof^a. Dr^a. Andréa Dias Neves Lago

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.” Provérbios 16:3

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e me conduzido com sabedoria até o presente momento. Sem Ele, nada disso seria possível de se realizar.

Em segundo lugar, expresso minha gratidão aos meus pais, Douglas Furtado e Claudinete Lacerda, que foram meus alicerces e provedores desde o início da minha vida até hoje. Mesmo sem nunca terem frequentado uma sala de aula universitária, eles não mediram esforços pela educação dos filhos. Hoje, posso me orgulhar de ser graduado e mestre, e isso é graças à incansável luta desses meus heróis. Obrigado, pai e mãe, pelo possível e impossível!

Agradeço à minha noiva, Louanne Gomes, por todo o apoio e incentivo desde o primeiro dia que nos conhecemos até os dias de hoje. Saiba que a luta é minha, mas o crescimento é nosso!

Expresso também minha gratidão à minha orientadora, Andréa Lago, que me acolheu desde a graduação até o mestrado, sempre de forma magistral e acolhedora, dando-me o apoio necessário para cumprir cada uma dessas missões.

Por fim, agradeço a todos os funcionários, professores e alunos da PPGO-UFMA e BoneLab-UPorto que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho e para o meu crescimento intelectual.

Lista de figuras

Figura 01 - Avaliação macroscópica dos fêmures.....	27
1.a - Imagens representativas da coloração histoquímica macroscópica de fêmures inteiros, usando a coloração com azul de Alcian e vermelho de Alizarina S (AB/AR).	
1. b - Comprimento da região mineralizada corada por AR.	
1.c - Proporção da seção mineralizada dos fêmures corados.	
Figura 02 - Imagens representativas de seções sagitais do fêmur tingidas com coloração AB/SR.....	29
Figura 03 - Imagens representativas da coloração AB/SR sob luz polarizada, destacando a birrefringência do colágeno.....	30

Lista de siglas

AB - Alcian Blue

ALP - Fosfatase Alcalina

AR - Alizarin Red S

ATP - Adenosina Trifosfato

BMP2 - Proteína Morfogenética Óssea 2

cAMP - Monofosfato de Adenosina Cíclico

COX - Citocromo C Oxidase

COL1A2 - Cadeia alfa 2 do Colágeno Tipo I

GAPDH - Desidrogenase do Gliceraldeído-3-Fosfato

IV – Infravermelho

J – Joules

KOH - Hidróxido de Potássio

MEC – Matrix Extracelular

mW – Miliwatts

Mm – Milímetros

MMPs - Metaloproteinases de Matriz

µg – Micrograma

µm – Microlitro

Nm – Nanômetros

OPG – Osteoprotegerina

PBS - Tamponada com Fosfato

RANKL - Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B Ligante

RUNX2 - Runt-related Transcription Factor 2

S – Segundos

SOX9 - SRY-like HMG [High-Mobility Group] Box 9

SOST – Esclerostina

SPP1 - Proteína Fosfoproteica Secretada 1

TFBM – Terapia de Fotobiomodulação

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

V – Vermelho

Resumo

Introdução: A terapia de fotobiomodulação (TFBM) utiliza luz não ionizante em comprimentos de onda específicos para acionar cromóforos endógenos, modulando vias metabólicas e induzindo resultados biológicos benéficos. Com foco em comprimentos de onda como azul-violeta, verde, vermelho e infravermelho próximo, a TFBM tem sido aplicada em diversas condições terapêuticas, incluindo lesões cerebrais, cicatrização de feridas e regeneração óssea. **Objetivo:** O estudo avaliou os efeitos da TFBM na remodelação óssea em um cenário fisiológico, utilizando um modelo ex vivo de fêmur embrionário de galinha. A pesquisa buscou compreender os impactos moleculares e celulares da TFBM no tecido ósseo e preencher lacunas sobre sua eficácia e protocolos de aplicação. **Metodologia:** 5 Ovos fertilizados de galinha (*Gallus domesticus*) foram cultivados na incubadora rotativa de ovos Octagon 40 ECO (Brinsea, Reino Unido) a uma temperatura de 37°C e 50% de umidade. No 11º dia, os embriões foram sacrificados e os fêmures inteiros foram cuidadosamente dissecados, removendo tecidos moles, como ligamentos e músculos aderentes. Os fêmures foram então colocados em inserções de cultura Netwell, que possuem uma membrana de poliéster com poros de 440µm e 30mm de diâmetro (Corning, Arizona, EUA). Os fêmures foram cultivados em placas de cultura de tecidos de 6 poços (Corning, Arizona, EUA) contendo 1mL de meio de cultura basal, composto por 1mL de α MEM, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 2,5µg/mL de anfotericina B, 50 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato (todos da Sigma). Os fêmures foram divididos em grupos de controle e tratamento (n=5). Nos grupos de tratamento, irradiou-se com um laser de diodo de baixa potência, utilizando luz nos comprimentos de onda vermelho (660nm) e infravermelho (808nm). Foi aplicado um modo de irradiação contínua e uma dose de 33,33J/cm², o que corresponde a 10s, 100mW, de modo que cada espécime recebeu 1,0J de dose de energia por irradiação. Os fêmures foram irradiados quatro vezes durante os 11 dias de cultura - imediatamente após a dissecação e 24 horas, 48 horas e 7 dias após a primeira irradiação. Como medida de padronização, foi definida uma distância de 1mm entre a fonte de laser e as amostras para evitar a dissipação de luz e a absorção máxima de energia. A análise foi realizada em 11 dias, com coloração histoquímica, análise histológica e expressão gênica. **Resultados:** Os fêmures irradiados mostraram aumento na área mineralizada, sugerindo maior

atividade osteoblástica nos dois comprimentos de onda. A análise histológica indicou maior deposição e maturação do colágeno nos grupos irradiados, com efeitos mais pronunciados no infravermelho. A expressão gênica revelou aumento significativo de RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) e SOX9 (SRY-like HMG [High-Mobility Group] Box 9), indicando maior compromisso osteocondrogênico, além de uma tendência de redução em SOST (Esclerostina). Conclusão: Os resultados sugerem que a TFBM, especialmente nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, não apenas preserva a estrutura óssea, mas também promove ativamente a formação óssea em condições fisiológicas. Este estudo fornece uma base sólida para futuras investigações sobre a aplicação clínica da TFBM na regeneração óssea.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; remodelação óssea; modelo ex vivo; laser vermelho; laser infravermelho.

Abstract

Introduction: Photobiomodulation therapy (PBM) utilizes non-ionizing light at specific wavelengths to activate endogenous chromophores, modulating metabolic pathways, and inducing beneficial biological outcomes. Focused on wavelengths such as blue-violet, green, red, and near-infrared, PBM has been applied in various therapeutic conditions, including brain injuries, wound healing, and bone regeneration. **Objective:** The study assessed the effects of PBM on bone remodeling in a physiological setting, using an *ex vivo* model of chicken embryonic femur. The research aimed to comprehend the molecular and cellular impacts of PBM on bone tissue and fill gaps in its efficacy and application protocols. **Methodology:** 5 fertilized chicken eggs (*Gallus domesticus*) were incubated in the Octagon 40 ECO egg incubator (Brinsea, UK) at a temperature of 37°C and 50% humidity. On the 11th day, the embryos were sacrificed, and the whole femurs were carefully dissected, removing soft tissues such as ligaments and adherent muscles. The femurs were then placed in Netwell culture inserts, which have a polyester membrane with pores of 440µm and 30mm in diameter (Corning, Arizona, USA). The femurs were cultured in 6-well tissue culture plates (Corning, Arizona, USA) containing 1mL of basal culture medium, composed of 1mL of αMEM, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, 2.5µg/mL amphotericin B, 50 µg/mL ascorbic acid 2-phosphate (all from Sigma). The femurs were divided into control and treatment groups (n=5). In the treatment groups, low-power diode laser irradiation was performed using red (660nm) and infrared (808nm) wavelengths. Continuous irradiation mode and a dose of 33.33J/cm² were applied, corresponding to 10s, 100mW, so that each specimen received 1.0J of energy dose per irradiation. The femurs were irradiated four times during the 11 days of culture - immediately after dissection and 24 hours, 48 hours, and 7 days after the first irradiation. As a standardization measure, a distance of 1mm was defined between the laser source and the samples to avoid light dissipation and maximize energy absorption. The analysis was conducted on day 11, involving histochemical staining, histological analysis, and gene expression. **Results:** Irradiated femurs showed an increase in the mineralized area, suggesting higher osteoblastic activity at both wavelengths. Histological analysis indicated increased collagen deposition and maturation in the

irradiated groups, with more pronounced effects in the infrared group. Gene expression revealed a significant increase in RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) and SOX9 (SRY-like HMG [High-Mobility Group] Box 9), indicating enhanced osteochondrogenic commitment, along with a trend of reduction in SOST (Sclerostin). Conclusion: The results suggest that PBM, especially in red and infrared wavelengths, not only preserves bone structure but actively promotes bone formation under physiological conditions. This study provides a solid foundation for future investigations into the clinical application of PBM in bone regeneration.

Keywords: Photobiomodulation; bone remodelling; ex vivo model; red laser; infrared laser

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE SIGLAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Osso e sua histologia	15
1.2 Modelação e remodelação óssea.....	16
1.3 Fotobiomodulação: histórico, mecanismo e aplicabilidade	17
1.4 Modelo experimental ex-vivo	20
2. ARTIGO	22
RESUMO	24
2.1. INTRODUÇÃO	25
2.2. METODOLOGIA.....	27
2.2.1 Estabelecimento do modelo ex vivo - culturas organotípicas de fêmures embrionários das aves	27
2.2.2 Fonte de luz e protocolo de irradiação.....	28
2.2.3 Coloração histoquímica do fêmur em montagem completa .	28
2.2.4 Processamento histológico e análise histoquímica	29
2.2.5 Análise de expressão gênica	29
2.2.6 Análise estatística	30
2.3 RESULTADOS	30
2.4 DISCUSSÃO	35
DECLARAÇÕES E FINANCIAMENTO	39
REFERÊNCIAS	40

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA	45
ANEXO B – NORMAS DA REVISTA CIENTIFICA.	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Osso e sua histologia

O osso é um tecido mineralizado e adaptativo constituído por tecido conjuntivo especializado que sofre mudanças constantes no decorrer da vida dos vertebrados, a fim de preservar o tamanho, forma e integridade estrutural do esqueleto e para regular a homeostase mineral (FARDIN et al., 2010; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Mesmo o osso sendo a parte mais dura do corpo dos vertebrados, é um tecido bastante dinâmico podendo mudar constantemente de forma dependendo de tensões colocadas sobre o mesmo (LESLIE P. GARTNER, 2017). Um exemplo dentro da odontologia são as forças ortodônticas e ortopédicas onde o cirurgião-dentista é capaz de remodelar o osso das arcadas dentárias movendo e alinhando os dentes para corrigir a má oclusão, proporcionando saúde e estética aos pacientes sendo ele adulto ou infantil (MAGRI et al., 2021).

A porção orgânica do osso, que constitui cerca de 35% do seu peso seco, é composta principalmente de proteínas, principalmente colágeno tipo I. O colágeno é uma proteína fibrosa que está disposta de forma paralela ao longo das fibras. Essas fibras são entrelaçadas, formando uma rede tridimensional. A rede de fibras de colágeno é impregnada com uma substância amorfa que contém proteoglicanos, mucopolissacarídeos, fosfato de cálcio e outros compostos. A hidroxiapatita é depositada nas fibras de colágeno nos processos de mineralização óssea. Para a manutenção da densidade óssea, é essencial que as células osteoblásticas sejam capazes de sintetizar novos minerais de hidroxiapatita e que esses minerais sejam adicionados à matriz óssea para manter ou aumentar o corpo mineral ósseo. (LESLIE P. GARTNER, 2017)

As principais células envolvidas na modelação e remodelação óssea são os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Estes três tipos de células possuem funções e origens diferentes, porém cada uma tem sua importância no processo fisiológico de modelagem e remodelação óssea. Os osteoclastos são originários dos monócitos e seu principal papel é a reabsorção, estes possuem características que os distingue

principalmente dos osteoblastos. São constituídos por múltiplos núcleos, sendo uma célula polimórfica e conseqüentemente tendo um maior diâmetro em relação aos osteoblastos e osteócitos. Na grande maioria das vezes estas células se localizam nas lacunas de *howship* onde acontece a reabsorção óssea. Estas células também possuem um metabolismo acelerado devido a grande presença de mitocôndrias no seu citoplasma. Além disso, possuem vários vacúolos repletos da enzima fosfatase ácida, que facilita a reabsorção óssea (GERBER, 2000; KATSIMBRI, 2017; LESLIE P. GARTNER, 2017; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Os osteoblastos são originários das células osteoprogenitoras e provenientes mesenquimais. Esse tipo celular é estimulado por proteínas morfogenéticas ósseas quando se inicia a osteogênese. Como descrito anteriormente essa célula se distingue morfofisiologicamente dos osteoclastos, sendo uma célula de um único núcleo, cúbica e basófila. Geralmente é encontrada na superfície do osso durante a modelação e remodelação. Os osteoblastos são primordiais no processo de ossificação pois secretam a matriz óssea e facilitam a mineralização óssea (GERBER; FERRARA, 2000; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010; KATSIMBRI, 2017; LESLIE P. GARTNER, 2017).

Os osteócitos são células menos complexas com menos organelas, possuem um núcleo ovalado com formato elíptico e razoavelmente basófila. Estas células são provenientes dos osteoblastos que ao ficarem presos na matriz óssea acabam produzindo sua própria matriz e se diferenciando em osteócitos. Essas células não sofrem divisão celular nem produzem nova matriz e são os tipos de células mais abundantes no osso (GERBER; FERRARA, 2000; LESLIE P. GARTNER, 2017; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

1.2 Modelação e remodelação óssea

Durante o decorrer da vida dos vertebrados, existem dois processos que sustentam o desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético, estes processos são denominados de modelação e remodelação óssea (FARDIN et al., 2010; KATSIMBRI, 2017). Na primeira infância, ocorrem tanto a modelação óssea quanto a remodelação óssea. O processo predominante na infância é a modelação óssea,

enquanto na idade adulta predomina a remodelação óssea. Porém, esse processo pode ser alterado após fraturas, quando há um aumento sólido na formação óssea (KATSIMBRI, 2017).

A remodelação óssea é responsável pela remoção e reparo do osso danificado para manter a integridade do esqueleto adulto e a homeostase mineral. Este processo fisiologicamente coordenado requer as atividades sincronizadas de vários tipos celulares para garantir que a reabsorção e a formação óssea ocorram sequencialmente no mesmo local anatômico para preservar a massa óssea (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). Um desequilíbrio desses dois processos leva a doenças minerais ósseas como osteoporose quando há perda óssea excessiva e osteopetrose quando há formação óssea excessiva (KATSIMBRI, 2017).

Diversos materiais, medicamentos e dispositivos são estudados com o propósito de estimular a modelação óssea e melhorar a qualidade e diminuir o tempo de remodelação óssea após traumas ou estímulos. Dentre os dispositivos com estes propósitos tem-se o laser. A fotobiomodulação ou laserterapia, consiste na irradiação de luz com a finalidade de promover o reparo tecidual, modular a inflamação e produzir analgesia, geralmente utilizando uma fonte de luz de baixa potência (laser ou led) (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

1.3 Fotobiomodulação: histórico, mecanismo e aplicabilidade

Foi por volta de 1905 que o físico Albert Einstein delineou os princípios teóricos que norteiam a tecnologia do aparelho de luz laser. O físico descobriu que a energia da luz é transferida em pequenas quantidades através de um experimento sobre o efeito fotoelétrico e que as mudanças atômicas em presença de um campo de radiações ocorrem por três mecanismos básicos: absorção de energia, emissão espontânea e emissão estimulada da radiação. Porém, foi apenas na segunda metade do século XX que o físico Theodore Maiman desenvolveu o primeiro aparelho de laser óptico. Este aparelho denominado “LOSER” possuía um meio ativo de rubi sintético com comprimento de onda por volta de 694nm, produzindo luz de curta duração e alta densidade de energia (GROSS; HERRMANN, 2007; LAGO, 2021).

Os primeiros relatos do uso do laser de baixa potência para fins de aplicações clínicas foram feitas por volta de 1967 pelo médico húngaro Endre Mester, com a teoria de “bioestimulação com laser” de úlceras crônicas de membros inferiores utilizando lasers de rubi e de argônio. A partir desse experimento houve uma crescente nas pesquisas utilizando lasers e um aumento considerável de seu uso clínico. Na década de 1980 os lasers já eram usados em diversas áreas médicas como cirurgia geral, dermatologia, otorrinolaringologia, neurocirurgia, dentre outras (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; LAGO, 2021).

Os efeitos clínicos benéficos da fotobiomodulação estão bem descritos na literatura. Porém, trabalhos sobre os efeitos a nível celular estão em desenvolvimento e existem teorias de como é a interação da luz com organelas intracelulares para que hajam efeitos no tecido biológico. Existem teorias em que a enzima citocromo c oxidase é o principal fotorreceptor mitocondrial responsável por absorver e desencadear uma cascata de efeitos no meio intracelular. (AMAROLI et al., 2020).

A teoria mais aceita atualmente é que a irradiação de luz monocromática é absorvida pelas mitocôndrias celulares (AMAROLI et al., 2020). As mitocôndrias irradiadas têm modificações em sua estrutura e alterações na sua função principal, especificamente na fosforilação oxidativa, além de alterações nas suas propriedades biossintéticas (PASSARELLA; KARU, 2014).

PASSARELLA e KARU (2014) também destacam um aumento no gradiente eletroquímico de prótons levando ao aumento da síntese de ATP nas células irradiadas e aumento na síntese e expressão gênica de DNA e RNA. Os autores mostraram que, além da estimulação da bioenergética mitocondrial, a irradiação pode resultar no aumento de processos não dependentes das mitocôndrias.

FREITAS e HAMBLIN (2016) descrevem alguns mecanismos moleculares da fotobiomodulação. Primeiramente o citocromo c oxidase (Cox) que é a enzima terminal da cadeia de transporte de elétrons, mediando a transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular. Os autores destacam a molécula como sendo um fotorreceptor e transdutor de fotossinais das irradiações no espectro visível e invisível próximo, indicando que a TFBM aumenta a disponibilidade de elétrons para

a redução de oxigênio molecular no centro catalítico de Cox, aumentando também o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e os níveis de ATP, monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e espécies reativas de oxigênio. Os outros mecanismos moleculares são a sinalização mitocondrial retrógrada apoiando a teoria descrita anteriormente por PASSARELLA e KARU (2014), canais iônicos sensíveis à luz e efeitos mediados por luz sem células diretas nas moléculas.

A ativação de alguns fatores de transcrição é de interesse para compreender o mecanismo de modelação e remodelação óssea. Dentre estes fatores está o RANKL ou receptor ativador do ligante do fator nuclear kappa-b, que é uma proteína transmembrana que age diretamente na ativação e diferenciação dos osteoclastos. É também um ligante para a osteoprotegerina (OPG). A relação RANKL/OPG determina se o osso é removido ou formado durante o processo de remodelação. O ciclo de remodelação consiste no aumento da expressão de RANKL pelos osteoblastos e posterior ligação ao receptor RANK, que é altamente expresso na membrana osteoclástica (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

INCERTI PARENTI et al. (2014) irradiaram células semelhantes a osteoblastos com laser de GaAIs (915nm) na tentativa de biomodular a interação RANKL/OPG. Os autores concluíram que houve um aumento rápido e transitório da relação RANKL/OPG para todas as doses testadas. Porém, foi apontado que pode haver uma diferença nos resultados dependendo do comprimento de onda utilizando e do tecido irradiado, pois há evidências de um aumento da relação RANKL/OPG em células derivadas de osso alveolar humano irradiadas com luz no comprimento de onda (808nm), enquanto em células de calvária de rato irradiadas com luz no comprimento de onda (650nm) os resultados foram o oposto.

O fator de transcrição 2 relacionado a runt (RUNX2) está diretamente relacionado à diferenciação osteoblástica e morfogênese esquelética, este fator atua como um elevador para os ácidos nucleicos e fatores regulatórios que estão envolvidos na expressão de genes relacionados a formação óssea. Regula também a expressão gênica relacionada aos componentes da matriz extracelular durante a proliferação celular. A irradiação com luz pode aumentar a expressão de RUNX-2,

levando a uma melhor organização na estrutura dos tecidos formados (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Ainda segundo (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016), a irradiação de baixa potência não interfere na osteossíntese, porém deve criar condições ambientais para acelerar a remodelação óssea. Proliferando e diferenciando osteoblastos, levando a um aumento da formação óssea, acompanhado por um aumento na atividade da fosfatase alcalina (ALP) e na expressão da osteocalcina. (AMID et al., 2014) publicaram uma revisão sobre a influência da fotobiomodulação na proliferação de osteoblastos. Os autores relataram que os comprimentos de onda entre 600nm e 1000nm têm sido utilizados e resultaram em efeitos positivos na odontologia, no processo antiinflamatório e na proliferação osteoblástica.

1.4 Modelo experimental ex-vivo

A fim de sanar as dúvidas existentes na atual literatura se a TFBM é realmente eficaz no processo de modelação e remodelação óssea e definir quais fatores de transcrição são modulados durante a irradiação óssea, o modelo *ex vivo* surge como uma metodologia acessível e eficaz para estas respostas. Os sistemas de cultura de órgãos permitem que a relação das células esqueléticas dentro de sua matriz extracelular seja mantida enquanto o ambiente externo pode ser manipulado por uma variedade de fatores externos (KANCZLER et al., 2012).

Neste contexto, o embrião de galinha foi descrito como um modelo experimental de desenvolvimento há muitos séculos, desde Aristóteles. Os modelos arcaicos serviram de inspiração para os estudos atuais, pois o embrião de galinha é bem caracterizado com um genoma totalmente sequenciado e ainda não possui um sistema imunológico formado. O modelo já vem sendo utilizado há um século na área das engenharias dos tecidos e agora está se tornando cada vez mais reconhecido como um sistema modelo viável em vários campos de pesquisa científica (SMITH et al., 2012).

O sistema de cultura de órgãos *ex vivo* são capazes de fornecer dados sobre a diferenciação celular e padrões de desenvolvimento de populações celulares coletiva

através de um tecido tridimensional e complexo. Isso permite que a expressão gênica e proteica, o padrão de crescimento estrutural e a modelação/remodelação sejam sistematicamente avaliados durante os estágios de crescimento e mineralização do osso embrionário (KANCZLER et al., 2012).

2. ARTIGO

Esta dissertação está baseada na normativa da Pró-Reitoria de Pesquisa Pós-graduação da Universidade Federal do Maranhão. Sendo assim composta de um capítulo, contendo um artigo que será enviado para publicação na revista Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.

Atividade osteoindutora da fotobiomodulação vermelha e infravermelha próxima em um modelo ex vivo de remodelação óssea

Guilherme Silva Furtado,^a Victor Martin,^{c,d} Rita Araújo,^{c,d} Pedro Sousa Gomes,^{c,d} Maria Helena Fernandes,^{c,d} , Andréa Dias Neves Lago,^b.

a Graduando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal Universidade do Maranhão, Brasil.

b Professor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal Universidade do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

c Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea, Faculdade de Odontologia Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

d REQUIMTE/LAQV, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Autor correspondente:

Andréa Dias Neves Lago

Endereço: Departamento de Odontologia I, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga - São Luís – MA, CEP 65080-805. telefone: +55 98 3272-8570/ 98 99197-1411. E-mail: adnlago@gmail.co

Resumo

A terapia de fotobiomodulação (TFBM) baseia-se na emissão de luz não ionizante em comprimentos de onda específicos, desencadeando a modulação de vias metabólicas que parecem induzir resultados biológicos positivos, levando à redução da inflamação e à cicatrização/regeneração superior do tecido. A TFBM pode ser especialmente vantajosa para aplicações em tecido ósseo por ser não invasiva e capaz de induzir a atividade osteoblástica e a vascularização dentro da estrutura de cicatrização. Apesar disso, o efeito da TFBM na remodelação óssea em um cenário fisiológico ainda não foi amplamente divulgado. Neste trabalho, o efeito da TFBM, nos comprimentos de onda vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm), foi avaliado em um sistema translacional de remodelação óssea - o modelo de fêmur embrionário organotípico de galinha, avaliando a expressão de genes relevantes, a deposição e maturação de colágeno e a formação de mineral ósseo. Os fêmures irradiados com ambos os comprimentos de onda apresentaram um aumento na expressão de fatores de transcrição osteogênicos (SOX9 e RUNX2), um aumento na deposição e maturação do colágeno fibrilar e uma superfície mineralizada mais alta, em comparação com amostras não irradiadas.

2.1. INTRODUÇÃO

A terapia de fotobiomodulação (TFBM) é uma terapia não invasiva baseada no uso de dispositivos que emitem luz não ionizante em comprimentos de onda específicos. É um processo não térmico no qual os sinais de luz acionam cromóforos endógenos, promovendo a modulação de vias metabólicas que podem, em última análise, induzir resultados biológicos favoráveis [1,2].

Entre os diferentes comprimentos de onda, o azul-violeta (405 - 420nm), o verde (540nm), o vermelho (660nm) e o infravermelho próximo (808nm) foram amplamente avaliados para fins terapêuticos, sendo os dois últimos os mais promissores devido à sua propensão a serem absorvidos pelas enzimas mitocondriais e a ativar canais iônicos sensíveis à luz [3]. Além disso, a absorção desses comprimentos de onda pelos tecidos orgânicos pode desencadear vias de sinalização celular associadas à síntese de fatores de crescimento e à redução do estresse oxidativo celular. [1], contribuindo para a redução geral da inflamação do tecido e acelerando ainda mais a cicatrização/regeneração do tecido [3-5].

Esses efeitos biológicos possibilitaram o uso da TFBM como terapia adjuvante para uma variedade de condições, como lesões traumáticas no cérebro e na medula espinhal, doença de Parkinson, cicatrização e rejuvenescimento de feridas na pele, queda de cabelo e mucosite oral causada por tratamentos oncológicos, entre outros [3]. A TFBM também pode regular positivamente a expressão da ciclooxigenase-2 (COX2) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), levando à melhora da angiogênese e da vascularização - mecanismos essenciais para a cicatrização de feridas e reparo de tecidos [6].

Com relação ao tecido ósseo, a TFBM tem sido relacionado à indução da neoformação óssea por meio do aumento da atividade celular em osteoblastos e da redução da atividade osteoclástica [3,7], contribuindo para melhorar os processos de reparo [3]. Osso é um tecido conjuntivo especializado que apresenta células aprisionadas em uma matriz extracelular colágena mineralizada [8], com uma complexa comunicação célula a célula e célula a matriz [9] - pode ser facilmente auxiliado por uma técnica não invasiva e abrangente como a TFBM [10].

A TFBM tem sido aplicada com sucesso para melhorar a regeneração óssea em condições de perda óssea grave, aceleração do movimento ortodôntico e como um complemento para melhorar o desempenho de estratégias baseadas em biomateriais para o reparo do tecido ósseo [3,11,12]. No entanto, o impacto da TFBM na remodelação óssea em um cenário fisiológico ainda não foi amplamente divulgado. Além disso, apesar das evidências da eficácia clínica da TFBM, ainda não há uma compreensão abrangente da base molecular e celular de seus efeitos na modulação do tecido ósseo, o que dificulta o campo de aplicação da TFBM e atrasa ainda mais a padronização adequada dos protocolos. Sua avaliação usando um modelo pré-clínico apropriado poderia fornecer dados confiáveis sobre esse assunto.

Nesse contexto, os estudos realizados *in vitro* se basearam no uso de culturas celulares bidimensionais, nas quais as interações célula-célula ou célula-matriz não puderam ser avaliadas adequadamente [3,7]. Também falta a capacidade de manter o arranjo espacial 3D adequado do tecido, o que é fundamental para manter suas propriedades biomecânicas que afetam principalmente a funcionalidade celular [13]. Além disso, a maioria dos estudos *in vivo* concentrou-se exclusivamente na avaliação da TFBM para terapias ósseas, em combinação com diferentes biomateriais, desconsiderando os possíveis efeitos modulatórios em condições fisiológicas [14-17]. Os estudos *in vivo* também são caros e demorados, e o uso de animais está associado a várias restrições do ponto de vista ético. Por fim, o metabolismo ósseo é modulado por uma ampla gama de fatores sistêmicos e locais que interagem, bem como por vias modulatórias [18] o que confere uma alta complexidade para avaliar individualmente os efeitos específicos da TFBM na funcionalidade do tecido ósseo.

Aqui, o modelo *ex vivo* de fêmur embrionário de galinha foi selecionado como um modelo experimental para avaliar os efeitos da TFBM na remodelação óssea, avaliando sua influência nas características histomorfológicas e no metabolismo celular subjacente. Esse modelo tem um longo histórico e um uso bem documentado em campos de pesquisa relacionados ao osso, como no desenvolvimento de biomateriais ósseos, câncer ou biologia do desenvolvimento ósseo, com alta translacionalidade para aplicações humanas [19]. Ele permite a avaliação das interações célula-célula e célula-matriz sobre os resultados biológicos, bem como os

efeitos sobre a microarquitetura do tecido, uma vez que o arranjo tridimensional não é interrompido. Além disso, a substituição de modelos *in vivo* em pesquisas científicas aborda os princípios 3R's (reduzir, reutilizar e reciclar), em conformidade com as diretrizes mais recentes [20].

2.2. METODOLOGIA

2.2.1 Estabelecimento do modelo *ex vivo* - culturas organotípicas de fêmures embrionários das aves

Ovos de galinha fertilizados (*Gallus domesticus*) foram cultivados em uma incubadora rotativa de ovos Octagon 40 ECO (Brinsea, Reino Unido) a 37°C e 50% de umidade. No 11º dia, os embriões foram sacrificados através do método de decaptação e os fêmures inteiros foram cuidadosamente dissecados, removendo tecidos moles, como ligamentos e músculos aderentes. Os fêmures foram colocados em inserções de cultura Netwell com uma membrana de poliéster com poros de 440µm e 30mm de diâmetro (Corning, Arizona, EUA). Os fêmures foram cultivados em placas de cultura de tecidos de 6 poços (Corning, Arizona, EUA) contendo 1mL de meio de cultura basal (1mL de α MEM, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 2,5µg/mL de anfotericina B, 50µg/mL de ácido ascórbico 2- fosfato, todos Sigma), na interface ar/líquido, e incubados em uma atmosfera umidificada de 5%CO₂/ 37°C. Os fêmures embrionários foram cultivados por 11 dias em condições basais como controle (sem irradiação) ou irradiados com um laser de diodo de baixa potência. Foram realizadas as seguintes condições: controle, irradiação vermelha e irradiação de infravermelho próximo (N=5). O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas.

No final do experimento, os fêmures cultivados foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH = 7,4), fixados com formaldeído 4% e processados para avaliação histoquímica de montagem completa, análise histológica ou análise de expressão gênica.

2.2.2 Fonte de luz e protocolo de irradiação

O equipamento de luz usado foi um laser de diodo de baixa potência (Laser Duo, MMO, São Carlos-SP, Brasil) que emite luz nos espectros vermelho (660nm) e infravermelho próximo (808nm). Neste estudo, foi aplicado um modo de irradiação contínua e uma dose de 33,33J/cm², o que corresponde a 10s, 100mW, de modo que cada espécime recebeu 1,0J de dose de energia por irradiação. Os fêmures foram irradiados quatro vezes durante os 11 dias de cultura - imediatamente após a dissecação e 24 horas, 48 horas e 7 dias após a primeira irradiação. Como medida de padronização, foi definida uma distância de 1mm entre a fonte de laser e as amostras para evitar a dissipação de luz e a absorção máxima de energia. [16–19]

2.2.3 Coloração histoquímica do fêmur em montagem completa

A técnica de dupla coloração em montagem total foi realizada para permitir a visualização da organização esquelética dos fêmures, com base em trabalhos anteriores [21]. Essa técnica se baseia no uso de Alcian blue (Merck SA, Darmstadt, Alemanha) para corar os tecidos enriquecidos com glicosaminoglicanos e Alizarin red S (Merck SA, Darmstadt, Alemanha) para corar o tecido mineralizado. Em resumo, a coloração com solução ácida de Alcian blue (0,01%) foi realizada por 16 horas. Depois disso, uma desidratação com etanol a 95% foi seguida por reidratação em uma série de etanol de graduação progressivamente decrescente. Em seguida, foi feita a coloração com solução de vermelho de alizarina S (0,002%) em hidróxido de potássio (KOH) a 0,5% por 24 horas, seguida de imersão em solução de KOH (2%) por 4 horas.

A limpeza do tecido foi feita imergindo os fêmures sucessivamente em misturas de 25%, 50% e 80% de KOH a 0,5% e glicerina, por 22 horas cada. Os fêmures foram armazenados em glicerol a 100% antes da geração de imagens em um microscópio Zeiss 305 Stereo (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) equipado com uma câmera digital Zeiss Axiocam 208 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Os dados histomorfométricos das regiões diafisárias (por exemplo, comprimento e proporção mineralizados) foram

obtidos com o software ImageJ (versão 1.53c). Os ensaios foram realizados em quintuplicatas.

2.2.4 Processamento histológico e análise histoquímica

O Alcian blue e o Picrosirius red foram combinados para produzir uma coloração distinta de colágeno (vermelho) e glicosaminoglicanos (azul), permitindo a visualização da matriz enriquecida com colágeno e glicosaminoglicanos na seção de tecido [22]. Resumidamente, os fêmures fixados foram processados para inclusão em parafina de rotina e cortados em seções de 5 µm de espessura. As seções foram desparafinizadas, hidratadas e coradas em solução de Alcian blue, pH 2,5, contendo 1 g de Alcian blue (Merck, Darmstadt, Alemanha), 3 mL de ácido acético glacial (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, EUA) e 97 mL de água destilada por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água e coradas com solução de Picrosirius red composta de 0,1 g de Sirius red (Sigma-Aldrich) e 100 mL de ácido pícrico aquoso saturado (Merck SA, Darmstadt, Alemanha) por 1 hora em temperatura ambiente.

Por fim, as amostras foram desidratadas, limpas e montadas. As amostras foram analisadas em um microscópio Zeiss 305 Stereo (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) Axiolab5 e no sistema de imagem digital Zeiss AxioCam 208 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Além disso, as amostras também foram avaliadas sob luz polarizada para a observação da birrefringência do colágeno, permitindo a diferenciação da maturação das fibras de colágeno - as fibrilas mais maduras foram coradas de amarelo a vermelho, enquanto as fibrilas menos maduras foram coradas de verde [23]. Os dados histomorfométricos das regiões diafisárias (por exemplo, porcentagem da área de colágeno) foram obtidos com o software ImageJ (versão 1.53c). Os ensaios foram realizados em quintuplicatas.

2.2.5 Análise de expressão gênica

Os fêmures congelados foram lisados em Trizol® (Invitrogen, San Diego, CA, EUA). O RNA total foi isolado do DNA e das proteínas com clorofórmio, de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas

por leitura de absorbância (260/280nm) usando um módulo Take3 (Gen5, BioTek) e um leitor de microplacas (Synergy HT; BioTek). Posteriormente, a conversão para cDNA foi realizada com um kit NZY quantitativo de transcrição reversa em duas etapas (NZYTECH), normalizando a concentração de RNA para 500ng/ μ L, seguida pela adição de RNase (NZY). Por fim, foi realizada uma reação de PCR quantitativa usando o sistema de PCR em tempo real CFX384 (Bio-Rad) com o iTaq Universal SYBR green Supermix (Bio-Rad) seguindo os protocolos de ciclagem da Bio-Rad. Foram utilizados *primers* otimizados da Bio-Rad para amplificação: GAPDH (ID de ensaio exclusivo: qGgaCED0029996); RUNX2 (ID de ensaio exclusivo: qGgaCID0019198); BMP2 (ID de ensaio exclusivo: qGgaCID0027472); SPP1 (ID de ensaio exclusivo: qGgaCED0023869); COL1A2 (ID de ensaio exclusivo: qGgaCED0025365); SOST (ID de ensaio exclusivo: qGgaCED0029174); SOX9 (ID de ensaio exclusivo: qGgaCED0029640). O controle de qualidade foi verificado com o Bio-Rad CFX Maestro 1.1, v.4.1.24. Por fim, a quantificação relativa de cada gene-alvo foi normalizada para o controle interno (níveis de GAPDH) e calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O ensaio foi realizado em quintuplicatas.

2.2.6 Análise estatística

Para dados quantitativos, as medidas foram calculadas e apresentadas como média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para conjuntos de dados normais, foi realizada uma ANOVA de um fator, seguida de comparações múltiplas usando o teste de Tukey. Para conjuntos de dados não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas usando os testes de Dunn. O SPSS Statistics (IBM, versão 26) foi usado para os cálculos. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p \leq 0,05$.

2.3 RESULTADOS

No presente estudo, fêmures dissecados de galinhas embrionárias do décimo primeiro dia (D11) foram cultivados na interface ar/líquido, a fim de manter a arquitetura típica da matriz tridimensional do osso.

A avaliação macroscópica dos fêmures foi feita com base na coloração histoquímica da matriz de cartilagem rica em glicosaminoglicanos e na contracoloração da matriz mineralizada pelos corantes Alcian Blue e Alizarin Red S (AB/AR), respectivamente, conforme mostrado na Fig. 1. Observa-se a manutenção da forma anatômica, do tamanho e da arquitetura 3D geral dos fêmures, durante todo o período de cultura, apresentando uma área diafisária mineralizada (vermelha) e uma área epifisária cartilaginosa (azul), evidenciadas pelas colorações (Fig. 1-a). Além disso, não foram detectados sinais de alterações histopatológicas significativas. Os grupos irradiados com laser parecem apresentar coloração mais pronunciada sobre a área diafisária, verificada pela análise quantitativa, apresentando uma tendência de aumento do comprimento do tecido mineral (Fig. 1-b). Além disso, o grupo do laser vermelho (V) apresentou uma proporção mineralizada significativamente maior em comparação com os grupos de controle e de infravermelho (IV) (Fig. 1-c).

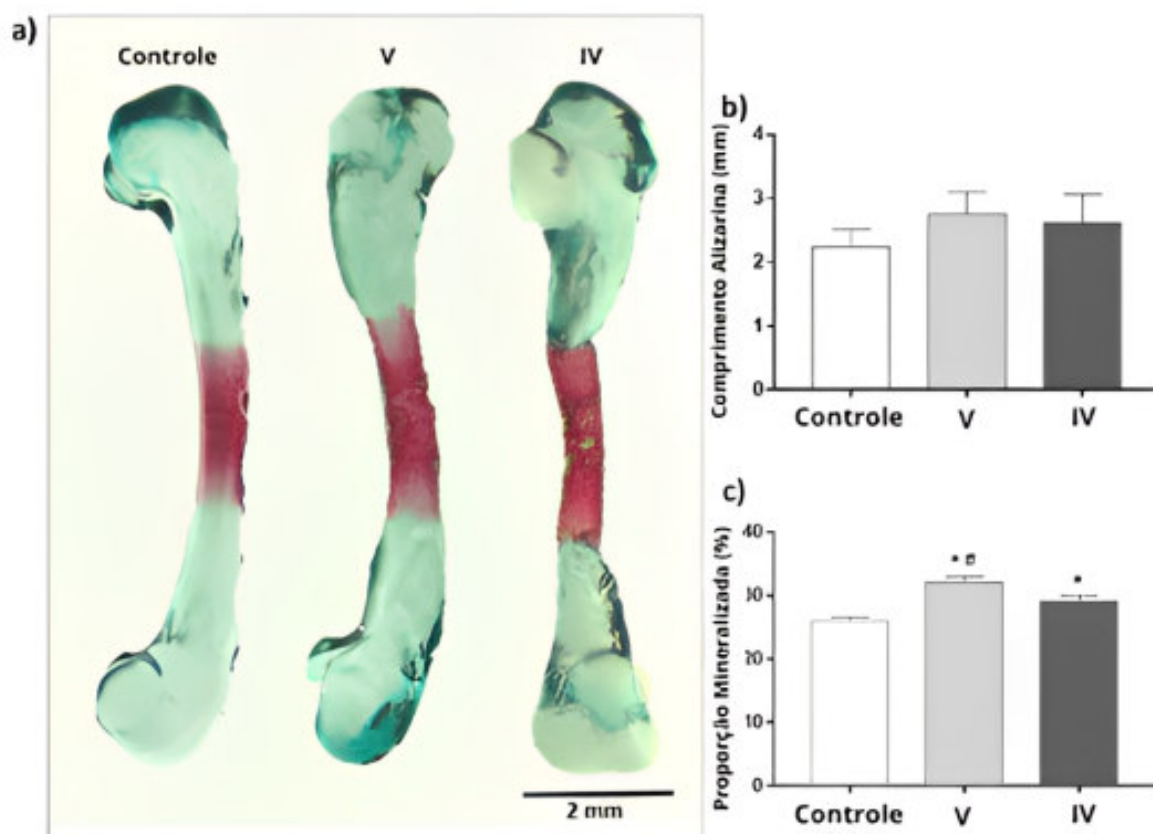


Figura 1. Avaliação macroscópica dos fêmures. a) Imagens representativas da coloração histoquímica macroscópica de fêmures inteiros, usando a coloração com azul de Alcian e vermelho de Alizarina S (AB/AR). b) Comprimento da região mineralizada corada por AR. c) Proporção da seção mineralizada dos fêmures corados. * Significativamente diferente do controle. # Significativamente diferente do grupo infravermelho. $p < 0,05$.

Para uma avaliação detalhada do tecido, com foco no componente mineralizado do osso na diáfise média, foram obtidas seções de tecido e coradas com a coloração AB/SR (Fig. 2). Nas amostras de controle, observa-se uma camada externa contínua de tecido colágeno com uma organização intrusiva do tipo trabecular em direção às camadas internas. A área mais interna da diáfise é composta principalmente de tecido rico em glicosaminoglicanos, evidenciado pela coloração azul. Da mesma forma, os grupos irradiados por laser apresentaram uma organização de tecido comparável. No entanto, as amostras expostas à luz infravermelha próxima exibiram uma camada externa de colágeno visivelmente mais espessa e trabéculas mais desenvolvidas, resultando em uma camada interna cartilaginosa mais estreita e zonas vazias centralizadas, caracterizadas como áreas de migração celular. A análise morfométrica quantitativa corroborou esses achados, nos quais a exposição ao laser de infravermelho próximo aumentou significativamente o conteúdo de colágeno na região diafisária, em comparação com o controle e o grupo irradiado com luz vermelha (fig. 2).

Para avaliar a microestrutura e a organização do colágeno, essas seções de tecido também foram observadas sob luz polarizada, revelando a birrefringência do colágeno do tecido corado por SR (fig. 3). No grupo de controle, verificou-se que os filamentos eram espessos e organizados de forma trabecular, exibindo principalmente coloração laranja a vermelha. Organização e acentuação de cor semelhantes foram observadas no grupo do laser vermelho. No entanto, um aumento significativo na espessura e na maturação dos filamentos foi detectado no grupo do infravermelho próximo, observado por uma cor vermelha mais vívida, confirmada pelos dados morfométricos quantitativos. De fato, a área de colágeno maturado foi duas vezes maior em relação aos outros grupos. É importante observar que o tecido residual do

periósteo foi observado em algumas amostras, exibido como uma fina camada externa corada em verde, devido à sua composição colágena e fibroelástica [24].

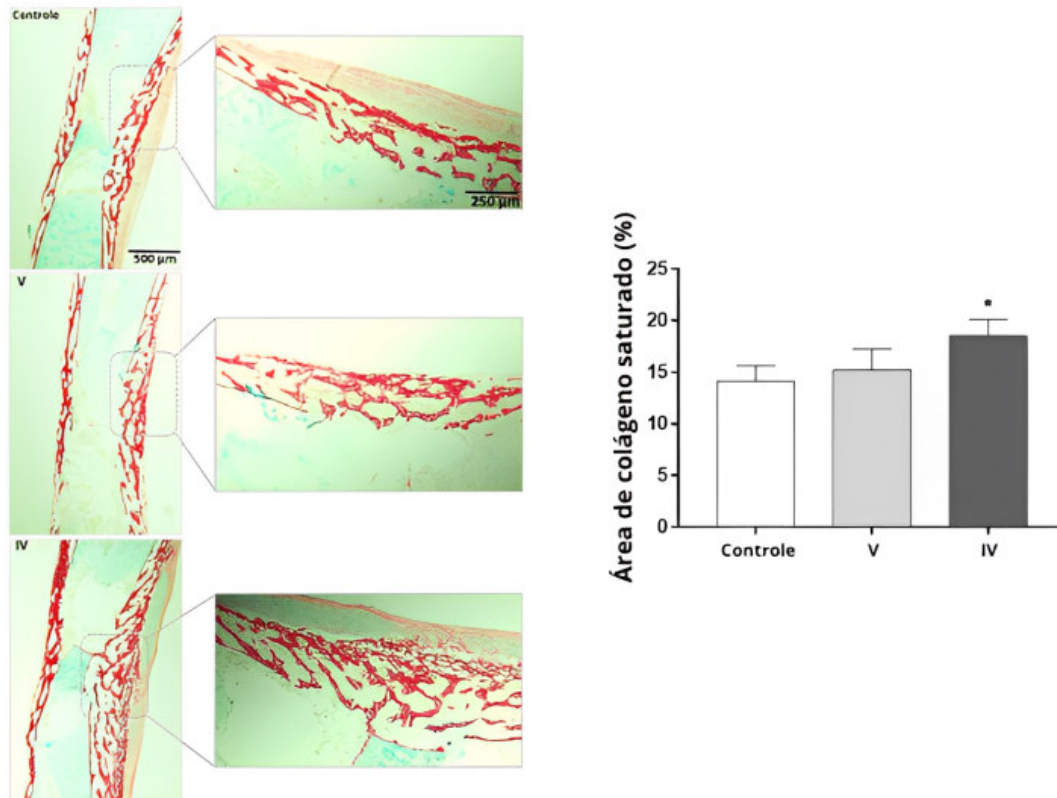


Figura 2. Imagens representativas de seções sagitais do fêmur tingidas com coloração AB/SR. O gráfico corresponde à análise quantitativa do tecido corado com vermelho Sirius, evidenciando a região depositada de colágeno. * Significativamente diferente do controle. $p < 0,05$.

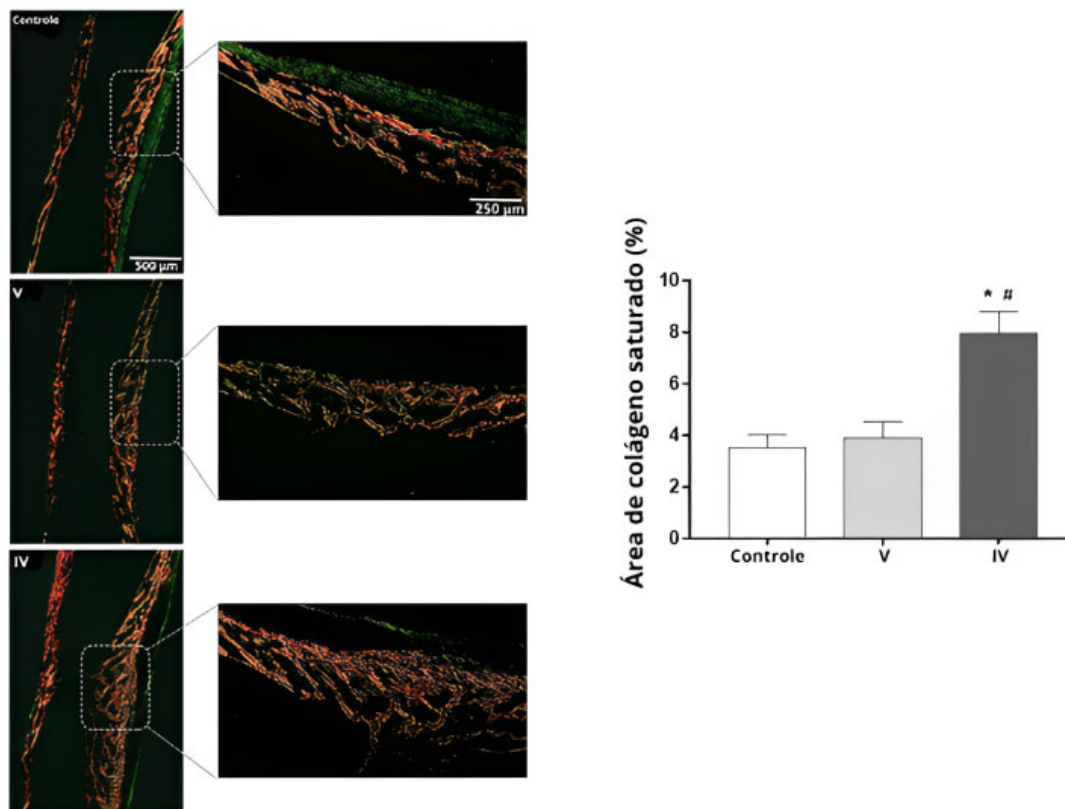
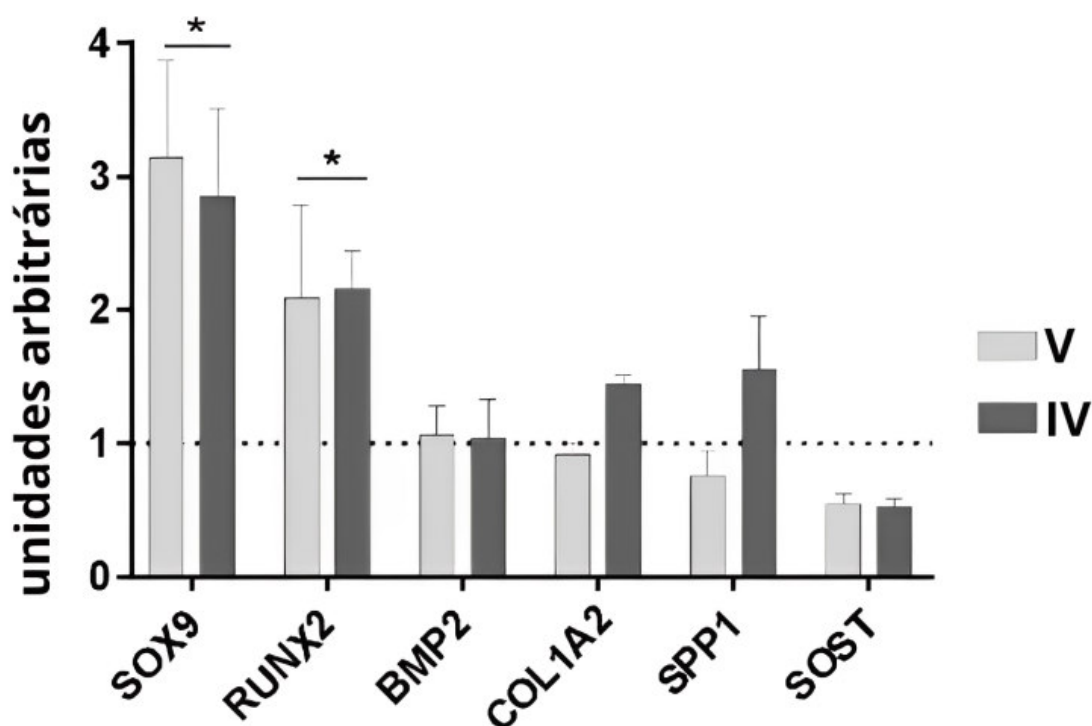


Figura 3. Imagens representativas da coloração AB/SR sob luz polarizada, destacando a birrefringência do colágeno. O gráfico corresponde à análise quantitativa da área de colágeno maduro. * Significativamente diferente do controle. # Diferença significativa em relação ao grupo vermelho. $p < 0,05$.

Com relação à expressão de genes osteocondrogênicos, diferenças notáveis podem ser observadas entre os grupos (fig. 4), como a regulação positiva significativa de SOX9 e RUNX2 em ambos os grupos irradiados com luz. Além disso, a esclerostina (SOST) revelou uma tendência de redução da regulação, também em ambos os grupos experimentais.



Controle = Normalizado para 1 (linha) pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$

* Diferente do controle

Diferente dos grupos experimentais

$p < 0,05$.

Figura 4. Expressão relativa de genes osteocondrogênicos de fêmures de galinha expostos à luz vermelha (V) e infravermelha (IV). A expressão do gene do grupo de controle é definida como 1, representada pela linha tracejada. * Significativamente diferente do controle. $p < 0,05$.

2.4 Discussão

Para melhorar o conhecimento atual sobre a capacidade da TFBM de modular o metabolismo ósseo, o presente estudo teve como objetivo avaliar seus efeitos do ponto de vista da biologia óssea fundamental, usando um modelo de pesquisa que replica as condições fisiológicas em vez do meio patológico associado à perda óssea. A maioria dos estudos concentrou-se no último, abordando principalmente a TFBM

como uma terapia adjuvante associada à cicatrização óssea [14-17], ou condições de metabolismo ósseo prejudicado [25,26]. Assim, o fêmur embrionário de galinha *ex vivo* apresenta-se como um modelo de estudo inovador, permitindo revelar a possível atividade moduladora da TFBM em um sistema de tecido translacional, capaz de mostrar as interações das células ósseas durante a remodelação, livre de influências regulatórias sistêmicas [19].

Os dados obtidos, de modo geral, convergem para apoiar a ideia de que a exposição à luz laser favorece o processo de formação óssea em condições de remodelação fisiológica, uma vez que foi obtida uma maior atividade osteoblástica inicial, resultando em maior deposição de matriz colagenosa e subsequente mineralização do tecido.

A análise da expressão gênica evidenciou o aumento da regulação de RUNX2 juntamente com a expressão de SOX9, sob a influência de ambos os comprimentos de onda, indicando efetivamente o aumento do compromisso osteocondrogênico precoce. SOX9 codifica o fator de transcrição SRY-Box 9, um fator de transcrição precoce determinante para a definição de osteocondroprogenitores no mesênquima em diferenciação [27]; enquanto o RUNX2 codifica o fator de transcrição 2 da família RUNX, necessário para a diferenciação osteoblástica [28]. De fato, o RUNX2 é reconhecido como o principal fator de transcrição para a osteogênese, sendo responsável pela regulação de marcadores relevantes a jusante, como a fosfatase alcalina e proteínas colágenas e não colágenas da matriz óssea, e correlacionado com eventos de diferenciação terminal, como a mineralização da matriz [29].

Estudos anteriores *in vitro* demonstraram a mesma tendência de aumento da expressão de RUNX2 após a estimulação com TFBM. Tani et al. [30] apontaram que o laser vermelho foi o mais eficiente na estimulação da expressão de RUNX2 em células estromais osteoblásticas e mesenquimais. Çevic et al. [31] relataram, da mesma forma, que a TFBM promoveu a expressão de genes relacionados à osteogênese, em modelos de cultura de células tridimensionais *in vitro*. Ateş et al [32] obtiveram resultados semelhantes na caracterização *in vitro* de osteoblastos humanos. Com relação aos possíveis mecanismos subjacentes, foi proposto que a

exposição ao laser - especialmente na faixa de luz vermelha a infravermelha próxima - ativa cromóforos intracelulares (por exemplo, porfirinas e citocromos) que aumentam a atividade mitocondrial, resultando em maior produção de ATP, desde que a dose empregada seja mantida dentro da faixa estimulatória - poucos J/cm^2 [33].

O ATP é um doador fundamental de fosfato, uma molécula de transferência de energia e uma molécula de sinalização capaz de influenciar várias vias de sinalização, inclusive a sinalização purinérgica [34], que foi anteriormente associada à regulação positiva de RUNX2 em osteoblastos [35]. Além do aumento do ATP, a modulação dos canais iônicos controlados pela luz pelo TFBM também pode regular a sinalização do cálcio intracelular [36], impactando conjuntamente a osteogênese mediada por RUNX2 [37]. Também é digna de nota a tendência de uma expressão reduzida de SOST em ambos os grupos irradiados. SOST codifica a esclerostina, um conhecido antagonista de Wingless e int-1 (Wnt) produzido por osteócitos para regular e limitar a formação óssea por meio da inibição da via de sinalização canônica de Wnt/ β -catenina em osteoblastos [38]. Estudos anteriores *in vitro* corroboraram esse achado [39,40]. Assim, a análise geral da expressão gênica converge para apoiar o aumento da atividade osteoblástica como resultado da TFBM.

Além disso, a análise histológica deixa claro que a deposição e a maturação do colágeno são aprimoradas em amostras expostas a ambos os comprimentos de onda de luz, confirmando ainda mais a regulação positiva da funcionalidade osteoblástica. Além disso, a análise de birrefringência com picrosirius red mostrou que as fibras de colágeno dentro da MEC (matriz extracelular) apresentam um desenvolvimento e uma maturação aprimorados, o que indica um nível mais alto de organização estrutural da proteína, normalmente associado à formação fibrilar de tripla hélice de colágeno tipo I mais avançada [41]. Esse efeito parece ser potencializado pelo comprimento de onda TFBM. Estudos *in vivo* anteriores demonstraram que a exposição à luz laser provoca a deposição de colágeno no contexto do reparo de defeitos ósseos associados a biomateriais [42,43], bem como em modelos de cicatrização de feridas na pele [44]. Embora os mecanismos associados ao aumento da deposição de colágeno em modelos de cicatrização de tecidos não tenham sido totalmente revelados, especula-se que a modulação da resposta inflamatória por meio da inibição da liberação de

citocinas pró-inflamatórias pode acelerar a fase aguda e favorecer a cicatrização, por meio da subsequente deposição de colágeno [45,46].

No presente estudo, foi estabelecida a capacidade da TFBM de acelerar o início da síntese e maturação do colágeno da MEC em um ambiente fisiológico.

Considerando a ausência de populações inflamatórias - já que o sistema é desprovido de resposta imunológica no início do desenvolvimento [19], outros mecanismos podem contribuir ainda mais para o resultado alcançado. O aumento do equilíbrio energético - elevando o metabolismo celular - pode apoiar a síntese proteica aprimorada, levando ao aumento da produção e maturação do colágeno [47]. Além disso, descobriu-se que a TFBM diminui a atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), as enzimas responsáveis pela degradação da MEC [48,49], o que pode sinergizar com o aumento da produção de colágeno, em uma deposição e maturação mais abundantes da MEC baseada em colágeno.

O estabelecimento de uma MEC abundante e madura permite o desenvolvimento adequado das interações célula-célula e célula-matriz, possibilitando um arranjo de tecido complexo e hierárquico e a integridade estrutural, que são cruciais para o processo de mineralização [50]. Nesse contexto, a matriz colagenosa serve como modelo para a deposição de hidroxiapatita. A biomineralização parece ocorrer por meio da formação de complexos mineral-proteína após a estabilização de precursores minerais de cálcio e fosfato desordenados por proteínas não colagenosas abrigadas nos microdomínios das fibrilas de colágeno reticuladas, sendo rigidamente regulada por promotores e inibidores da nucleação e crescimento de cristais [51].

Atualmente, a coloração histoquímica do tecido revelou um aumento da superfície mineralizada, evidenciada pela coloração Alizarin Red S, em amostras expostas à irradiação a laser, sugerindo que a TFBM oferece condições favoráveis ao processo de mineralização. Estudos anteriores, tanto *in vitro* [52-54], ou no contexto da regeneração de defeitos ósseos com biomateriais de suporte [14- 17], sustentaram a capacidade da TFBM de induzir a mineralização. Mecanicamente, a modulação das vias de sinalização Smad pode estar envolvida. A sinalização Smad parece ser fundamental para os eventos de diferenciação e mineralização osteoblástica terminal

[55] e estudos anteriores *in vitro* demonstraram o aumento da atividade da Smad após a aplicação de TFBM [56].

De modo geral, descobriu-se que a TFBM com comprimentos de onda vermelhos ou infravermelhos próximos induz a funcionalidade osteoblástica em um sistema fisiológico de remodelação do tecido ósseo - a cultura organotípica do fêmur embrionário de galinha. A expressão aumentada dos principais fatores de transcrição osteogênica - SOX9 e RUNX2 -, o aumento da deposição e maturação do colágeno e a mineralização aprimorada corroboram esse resultado. Os resultados do presente estudo ampliam o conhecimento atual sobre os efeitos da TFBM no osso, fornecendo evidências de que ele pode modular o metabolismo ósseo ao induzir a atividade osteoblástica em condições fisiológicas.

Declarações e financiamento

Declaramos que este trabalho não possui conflito de interesse.

Agradecimentos: Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Santander ibero-americanas pelo apoio financeiro fornecido.

Este trabalho também recebeu apoio financeiro de fundos nacionais do PT (FCT/MCTES, Fundação para a Ciência e Tecnologia e Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) através dos projetos UIDB/50006/2020 e UIDP/50006/2020.

Referências

1. FARDIN AC, JARDIM ECG, PEREIRA FC, et al (2010) Bone graft in dentistry: review of literature. *Innov Implant J* 5:48–52
2. Raggatt LJ, Partridge NC (2010) Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J Biol Chem* 285:25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
3. Leslie P. Gartner (2017) *Text-book of Histology*, Fourth edi. Philadelphia
4. Magri AMP, Parisi JR, Andrade ALM, Rennó ACM (2021) Bone substitutes and photobiomodulation in bone regeneration: A systematic review in animal experimental studies. *J Biomed Mater Res Part A* 109:1765–1775. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37170>
5. Katsimbri P (2017) The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)* 26:e12740. <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>
6. Gerber H (2000) Angiogenesis and Bone Growth. *Trends Cardiovasc Med* 10:223–228. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(00\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(00)00074-8)
7. de Freitas LF, Hamblin MR (2016) Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 22:348–364. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
8. Lago ADN (2021) *Laser na odontologia [recurso eletrônico]: conceitos e aplicações clínicas*. São Luís
9. Gross AJ, Herrmann TRW (2007) History of lasers. *World J Urol* 25:217–220. <https://doi.org/10.1007/s00345-007-0173-8>
10. Amaroli A, Colombo E, Zekiy A, et al (2020) Interaction between Laser Light and Osteoblasts: Photobiomodulation as a Trend in the Management of Socket Bone Preservation—A Review. *Biology (Basel)* 9:409. <https://doi.org/10.3390/biology9110409>
11. Passarella S, Karu T (2014) Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J Photochem Photobiol B Biol* 140:344–358. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021>
12. Incerti Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschon M (2014) Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells. *J Biomed*

- Opt 19:108002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.10.108002>
13. Amid R, Kadkhodazadeh M, Ahsaie MG, Hakakzadeh A (2014) Effect of low level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. *J lasers Med Sci* 5:163–70
 14. Kanczler JM, Smith EL, Roberts CA, Oreffo ROC (2012) A Novel Approach for Studying the Temporal Modulation of Embryonic Skeletal Development Using Organotypic Bone Cultures and Microcomputed Tomography. *Tissue Eng Part C Methods* 18:747–760. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0033>
 15. Smith EL, Kanczler JM, Roberts CA, Oreffo ROC (2012) Developmental Cues for Bone Formation from Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein in an Ex Vivo Organotypic Culture System of Embryonic Chick Femora. *Tissue Eng Part C Methods* 18:984–994. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0132>
 16. Barboza CAG, Ginani F, Soares DM, et al (2014) Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein (São Paulo)* 12:75–81. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082014AO2824>
 17. Impellizzeri A, Horodyski M, Fusco R, et al (2020) Photobiomodulation Therapy on Orthodontic Movement: Analysis of Preliminary Studies with a New Protocol. *Int J Environ Res Public Health* 17:3547. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103547>
 18. Incerti Parenti S, Tschon M, Sartori M, et al (2020) Evidence from systematic reviews on photobiomodulation of human bone and stromal cells: Where do we stand? *Arch Biochem Biophys* 685:108333. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108333>
 19. de Oliveira RF, da Silva CV, de Paula JT, et al (2021) Effectiveness of Laser Therapy and Laser Acupuncture on Treating Paraesthesia After Extraction of Lower Third Molars. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg* 39:774–781. <https://doi.org/10.1089/photob.2021.0022>

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo investigou os efeitos da TFBM no contexto da remodelação óssea, utilizando um modelo de cultura *ex vivo* do fêmur de embrião de galinha. A exposição à luz laser nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, revelou promover a formação óssea ao aumentar a atividade inicial dos osteoblastos. Isso resultou em uma maior deposição de matriz colágena e consequente mineralização do tecido ósseo.

A análise de expressão gênica destacou um aumento nos fatores de transcrição chave para osteogênese, como o RUNX2 e SOX9, tanto no comprimento de onda vermelho quanto o infravermelho. Isso sugere um comprometimento precoce com a formação de ossos e cartilagens. Os possíveis mecanismos subjacentes envolvem a ativação de cromóforos intracelulares pela luz laser, o que leva a uma maior produção de ATP, fundamental para influenciar várias vias de sinalização relacionadas à formação óssea.

As análises histológicas indicaram uma melhora na deposição e maturação do colágeno nos tecidos expostos à irradiação a laser, especialmente com o comprimento de onda infravermelho. A TFBM parece acelerar a síntese e maturação do colágeno, além de diminuir a atividade de enzimas de degradação da matriz, resultando em uma matriz extracelular mais abundante e madura, facilitando a mineralização.

Portanto, os resultados do estudo evidenciam o potencial da TFBM em estimular a funcionalidade osteoblástica em condições fisiológicas de remodelação óssea, ampliando o conhecimento sobre os efeitos da TFBM no metabolismo ósseo. Essas descobertas podem ter importância para investigações subsequentes voltadas para aplicações clínicas destinadas a aprimorar a saúde óssea e abordar condições relacionadas ao sistema esquelético.

Referências

1. FARDIN AC, JARDIM ECG, PEREIRA FC, et al (2010) Bone graft in dentistry: review of literature. *Innov Implant J* 5:48–52
2. Raggatt LJ, Partridge NC (2010) Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J Biol Chem* 285:25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
3. Leslie P. Gartner (2017) *Text-book of Histology*, Fourth edi. Philadelphia
4. Magri AMP, Parisi JR, Andrade ALM, Rennó ACM (2021) Bone substitutes and photobiomodulation in bone regeneration: A systematic review in animal experimental studies. *J Biomed Mater Res Part A* 109:1765–1775. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37170>
5. Katsimbri P (2017) The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)* 26:e12740. <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>
6. Gerber H (2000) Angiogenesis and Bone Growth. *Trends Cardiovasc Med* 10:223–228. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(00\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(00)00074-8)
7. de Freitas LF, Hamblin MR (2016) Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 22:348–364. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
8. Lago ADN (2021) *Laser na odontologia [recurso eletrônico]: conceitos e aplicações clínicas*. São Luís
9. Gross AJ, Herrmann TRW (2007) History of lasers. *World J Urol* 25:217–220. <https://doi.org/10.1007/s00345-007-0173-8>
10. Amaroli A, Colombo E, Zekiy A, et al (2020) Interaction between Laser Light and Osteoblasts: Photobiomodulation as a Trend in the Management of Socket Bone Preservation—A Review. *Biology (Basel)* 9:409. <https://doi.org/10.3390/biology9110409>
11. Passarella S, Karu T (2014) Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J Photochem Photobiol B Biol* 140:344–358. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021>
12. Incerti Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschon M (2014) Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells. *J Biomed*

- Opt 19:108002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.10.108002>
13. Amid R, Kadkhodazadeh M, Ahsaie MG, Hakakzadeh A (2014) Effect of low level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. *J lasers Med Sci* 5:163–70
 14. Kanczler JM, Smith EL, Roberts CA, Oreffo ROC (2012) A Novel Approach for Studying the Temporal Modulation of Embryonic Skeletal Development Using Organotypic Bone Cultures and Microcomputed Tomography. *Tissue Eng Part C Methods* 18:747–760. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0033>
 15. Smith EL, Kanczler JM, Roberts CA, Oreffo ROC (2012) Developmental Cues for Bone Formation from Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein in an Ex Vivo Organotypic Culture System of Embryonic Chick Femora. *Tissue Eng Part C Methods* 18:984–994. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0132>
 16. Barboza CAG, Ginani F, Soares DM, et al (2014) Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein (São Paulo)* 12:75–81. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082014AO2824>
 17. Impellizzeri A, Horodyski M, Fusco R, et al (2020) Photobiomodulation Therapy on Orthodontic Movement: Analysis of Preliminary Studies with a New Protocol. *Int J Environ Res Public Health* 17:3547. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103547>
 18. Incerti Parenti S, Tschon M, Sartori M, et al (2020) Evidence from systematic reviews on photobiomodulation of human bone and stromal cells: Where do we stand? *Arch Biochem Biophys* 685:108333. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108333>
 19. de Oliveira RF, da Silva CV, de Paula JT, et al (2021) Effectiveness of Laser Therapy and Laser Acupuncture on Treating Paraesthesia After Extraction of Lower Third Molars. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg* 39:774–781. <https://doi.org/10.1089/photob.2021.0022>

Este trabalho possui aprovação da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA com número de registro nº 23115.014754/2023-50.

Anexo B – Normas da revista científica Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.

Guide for authors

<ul style="list-style-type: none"> • Your Paper Your Way 		<ul style="list-style-type: none"> • Keywords
INTRODUCTION	<ul style="list-style-type: none"> • Copyright 	<ul style="list-style-type: none"> • Nomenclature and Units
<ul style="list-style-type: none"> • Contact Details for Submission 	<ul style="list-style-type: none"> • Role of the funding source 	<ul style="list-style-type: none"> • Artwork
<ul style="list-style-type: none"> • Submission checklist 	<ul style="list-style-type: none"> • Open access 	<ul style="list-style-type: none"> • Tables
BEFORE YOU BEGIN	<ul style="list-style-type: none"> • Submission 	<ul style="list-style-type: none"> • References
<ul style="list-style-type: none"> • Ethics in publishing 	<ul style="list-style-type: none"> • Referees 	<ul style="list-style-type: none"> • Reference Style
<ul style="list-style-type: none"> • Declaration of competing interest 	PREPARATION	<ul style="list-style-type: none"> • Video
<ul style="list-style-type: none"> • Declaration of generative AI in scientific writing 	<ul style="list-style-type: none"> • Queries 	<ul style="list-style-type: none"> • Data visualization
<ul style="list-style-type: none"> • Submission declaration and verification 	NEW SUBMISSIONS	<ul style="list-style-type: none"> • Supplementary material
<ul style="list-style-type: none"> • Preprint posting on SSRN 	<ul style="list-style-type: none"> • Peer review 	<ul style="list-style-type: none"> • Research data
<ul style="list-style-type: none"> • Use of inclusive language 	REVISED SUBMISSIONS	AFTER ACCEPTANCE
<ul style="list-style-type: none"> • Reporting sex- and gender-based analyses 	<ul style="list-style-type: none"> • Article structure 	<ul style="list-style-type: none"> • Online proof correction
<ul style="list-style-type: none"> • Author contributions 	<ul style="list-style-type: none"> • Essential title page information 	<ul style="list-style-type: none"> • Offprints
<ul style="list-style-type: none"> • Changes to authorship 	<ul style="list-style-type: none"> • Highlights 	AUTHOR INQUIRIES
	<ul style="list-style-type: none"> • Abstract 	

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the

revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Introduction

The *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (JPPB) welcomes Invited review articles and original papers not previously published

The journal provides a forum for the publication of papers relating to the various aspects of photobiology, as well as a means for communication in this multidisciplinary field. The scope includes:

- bioluminescence
- chronobiology
- DNA repair
- environmental photobiology
- nanotechnology in photobiology
- photocarcinogenesis
- photochemistry of biomolecules
- photomedicine
- photomorphogenesis
- photomovement
- photoreception
- photosensitization
- photosynthesis
- phototechnology
- spectroscopy of biological systems

- UV and visible radiation effects
- vision

This journal is cited by the following Abstracting Services: BIOSIS, Cambridge Scientific Abstracts, Chemical Abstracts, Current Contents, Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences, EMBASE/Excerpta Medica, Embiology, Engineering Index, Medlar's System, Metals Abstracts, PASCAL/CNRS, Physics Abstracts, Physikalische Berichte, Polymer Contents, Research Alert™, Science Citation Index, Scopus.

Contact Details for Submission

Authors are requested to submit their article to the Editor responsible for the topic involved:

Dr. Laszlo Matyus: Biophysics, Biomolecular spectroscopy, Photodynamic Therapy, Dermatology, Photomedicine.

Dr. Robert Carpentier: Photosynthesis, Environmental photobiology, Photosensitisers, Oxygen radicals, DNA repair, UV/VIS effects.

Dr. Ramaiah: Photochemistry of biomolecules, Photodynamic therapy, Photosensitization, Molecular probes, Phototechnology, Nanotechnology in photobiology. **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Before you begin

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#). **Declaration of competing interest**

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required. Declaration of generative AI in scientific writing**

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be

attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's [AI policy for authors](#).

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

Disclosure instructions

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that

its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software. ***Preprints***

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information). **Preprint posting on SSRN**

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive. **Reporting sex- and gender-based analyses**

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they

should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER guidelines checklist](#). These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition

guidance and the SAGER guidelines, the [resources on this page](#) offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

For transparency, we require corresponding authors to provide co-author contributions to the manuscript using the relevant CRediT roles. The [CRediT taxonomy](#) includes 14 different roles describing each contributor's specific contribution to the scholarly output. The roles are: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. Note that not all roles may apply to every manuscript, and authors may have contributed through multiple roles. [More details and an example](#). **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted.

While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum. **Article transfer service**

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#). **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals. **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this. **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information about open access publishing in this journal. ***Elsevier Researcher Academy***

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease. ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [Language Editing service](#) available from Elsevier's Language Services. **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

For submitting your manuscript to JPPB please go to our Editorial Manager website

at: <https://www.editorialmanager.com/JPHOTOBIOL/default.aspx> For technical support during the submission process, please visit the [Elsevier Support Center](#). For general questions, contact Dr. Robert Carpentier (Robert.Carpentier@uqtr.ca), Dr. Laszlo Matyus (lmatyus@med.unideb.hu), or Dr. Dominic Robinson (d.robinson@erasmusmc.nl). **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 5 potential referees. The referees should not be editorial board members or from the same institute or geographical region as the authors.

Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#). **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. **References**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this

should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections. ***Figures and tables embedded in text***

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table. **Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#). **REVISED SUBMISSIONS** *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. ***LaTeX***

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information. **Article structure *Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. **Material and methods**

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described. **Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis. **Results**

Results should be clear and concise. **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. ***Graphical abstract***

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be

placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the

article.***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and Units

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and

conventions: use the international system of units (SI). The only exception is the use of min, h, d and a as units for elapsed time, though never when combined algebraically with other units. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. Consult the IUPAC "Glossary of Terms Used in Photochemistry" for the correct terminology (source: The Spectrum, Bowling Green, Vol.16, 1, 2003, p 16), (online:

www.bgsu.edu/departments/photochem), (cited link:

http://www.aspjournals.com/auth_instruct.html)

UV ranges. The official UV ranges as defined by the CIE must be used:

UV-A: 400-315nm

UV-B: 315-280nm

UV-C: 280-100nm ***Math formulae***

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. ***Artwork Image manipulation***

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within

an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend. ***Electronic artwork***

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#) ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. ***Text graphics***

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork. **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described

elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells. **References** *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. **Reference links**

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference

was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article. ***Preprint references***

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced.

Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided. ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes

before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#). **Reference formatting**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: **Reference Style**

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual Authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result...."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] B.K. Armstrong, A. Krickler, The epidemiology of UV induced skin cancer, J. Photochem. Photobiol. B 63 (2001) 8-18.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing, Inc., New York, 1994, pp. 281-304.

[4] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1> **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers

interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article. **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version. **Research data**

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

After acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their

final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).