



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

JOÃO PAULO SOARES FRANCISCON

**Efetividade do gel liberador de oxigênio ativo associado à
terapia fotodinâmica antimicrobiana como tratamento
preventivo para a osteonecrose dos maxilares induzida por
medicamentos**

Araçatuba - SP
2023

JOÃO PAULO SOARES FRANCISCON

**Efetividade do gel liberador de oxigênio ativo associado à
terapia fotodinâmica antimicrobiana como tratamento
preventivo para a osteonecrose dos maxilares induzida por
medicamentos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Edilson Ervolino
Coorientadora: Prof. Assoc. Letícia Helena Theodoro

Araçatuba - SP
2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F819e terapia	Franciscon, João Paulo Soares. Efetividade do gel liberador de oxigênio ativo associado à fotodinâmica antimicrobiana como tratamento preventivo para a osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos /João Paulo Soares Franciscon. – Araçatuba, 2023. 64 f.: 6 il.; 2 tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Edilson Ervolino Coorientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro 1. Osteonecrose 2. Espécies reativas de oxigênio 3. Ácido zoledrônico 4. Fotoquimioterapia I.T. Black D6 CDD 617.64
------------------	---

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Aos meus pais,

*Hélio Flávio Franciscan Filho e Lilian Maria de Godoy Soares,
sem eles não estaria aqui, não só pela paternidade, mas pela
confiança e amor por mim.*

A minha irmã,

*Marília Soares Franciscan, companheira, amiga e motivo de toda
minha dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelas oportunidades e força quando eu mais precisei.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Agradeço ao Prof. Dr. Edilson Ervolino, meu orientador, por tudo que fez a mim desde o início do mestrado, pela quantidade de conhecimento que ganhei durante esses dois anos e pela amizade.

Agradeço à Prof. Dra. Leticia Helena Theodoro, minha coorientadora, por todos os ensinamentos, por toda dedicação para minha formação como profissional da odontologia e futuro professor.

Agradeço aos professores Leonardo Perez Faverani, Valdir Gouveia Garcia, Tatiana Miranda Deliberador. Pela ajuda nos estudos e considerações importantes para o trabalho.

Agradeço aos meus amigos de mestrado e departamento Glauco Rodrigues Carmo Silveira e Eduardo Quintão Manhanini Souza por tudo que fizeram por mim nesses anos e que se refletiu nesse trabalho.

Agradeço minha namorada Gabriele Oliveira Amaral, por todo o incentivo, por acreditar em mim e principalmente por se mostrar minha companheira, ajudando na correção do trabalho e aguentando os momentos mais difíceis do mestrado ao meu lado, sendo fundamental para me manter seguindo em frente.

Ao Mestre Tiago Esgalha da Rocha, meu amigo, por sempre ser

solicito e peça essencial para elaboração deste trabalho.

Agradeço a toda equipe do departamento de ciências básicas, os presentes no meu ano de mestrado e aos antecessores, desse grupo lindo de pesquisa autointitulado família ZOL.

Agradeço toda sociedade brasileira pelo financiamento de meus estudos na graduação, no mestrado acadêmico e do presente trabalho através dos impostos direcionados à educação pública.

Agradeço todos funcionários da FOA, pela dedicação em demasia à instituição, mantendo o ambiente de trabalho limpo e possível de ser produtivo com segurança e qualidade.

Agradeço a CAPES e a FAPESP por todos os esforços e contribuições à pesquisa brasileira.

Agradeço a Biblioteca da FOA pelo auxílio nas normativas do trabalho, bem como a Pós-graduação por toda a assistência e aos funcionários do departamento de ciências básicas.

Agradeço a empresa Blue®m por ceder o gel liberador de oxigênio ativo e financiar parte da pesquisa, sem qualquer conflito de interesse.

"Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem. Ou que seus planos nunca vão dar certo. Ou que você nunca vai ser alguém. "

Renato Russo

FRANCISCON, J. P. S. **Efetividade do gel liberador de oxigênio ativo associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana como tratamento preventivo para a osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos**. 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2023.

RESUMO

A osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM) é uma condição patológica de difícil tratamento. Sendo assim, a conduta ideal é o estabelecimento de estratégias que visem prevenir sua ocorrência. A terapia tópica com gel liberador de oxigênio ativo (TTGLOA) e a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) apresentam concomitantemente atividade antimicrobiana e ação biomodulatória, o que as colocam como potenciais estratégias preventivas para a ONMM. O objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade do TTGLOA em associação com aPDT no processo de reparo alveolar em ratas senescentes tratadas com dose oncológica de zoledronato, e analisar o seu potencial na prevenção da ocorrência da ONMM. Vinte e oito ratas senescentes foram divididas em quatro grupos experimentais: NTL, TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT. No dia 0 foi realizada a instalação de uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior do lado esquerdo para indução da periodontite experimental. Do dia 1 ao dia 50 as ratas receberam, a cada 3 dias, 0,45 ml de zoledronato (100 µg/Kg), pela via intraperitoneal. Após 3 semanas de tratamento com zoledronato foi efetuada a extração do primeiro molar inferior do lado esquerdo. No grupo NTL (n=7) não foi efetuado nenhum tratamento local. No grupo TTGLOA (n= 7) e no grupo aPDT (n=7), os alvéolos foram submetidos a três sessões de TTGLOA e aPDT, respectivamente. No grupo TTGLOA+aPDT (n=7) os alvéolos foram submetidos a três sessões de TTGLOA seguida de aPDT. Os tratamentos locais foram efetuados aos 0, 2 e 4 após exodontia. As eutanásias foram realizadas aos 28 dias pós exodontia. As hemimandíbulas foram devidamente processadas para permitir: análise histológica, análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) e de tecido ósseo não vital (TONV) e análise imunoistoquímica (BMP2/4, proteína morfogenética óssea 2/4 e; OCN, osteocalcina). O grupo NTL apresentou grande comprometimento do processo de reparação tecidual. Os grupos TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT apresentaram um processo de reparação tecidual favorável do sítio de extração dental. No grupo NTL a porcentagem

de TONF foi menor, enquanto que, a porcentagem de TONV foi maior, que nos demais grupos. O grupo TTGLOA apresentou menor porcentagem de TONF e maior porcentagem de TONV quando comparado com os grupos aPDT e TTGLOA+aPDT. No grupo TTGLOA+aPDT a porcentagem de TONF foi maior que no grupo aPDT. O grupo TTGLOA+aPDT apresentou o maior padrão de imunomarcacão para BMP2/4 e para OCN. A TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT foram capazes de evitar a ocorrência da ONMM pós exodontia com diferentes níveis de efetividade. Como monoterapia, a aPDT foi superior a TTGLOA, todavia, a maior efetividade foi obtida com o emprego da TTGLOA+aPDT.

Palavras-chave: Osteonecrose. Espécies Reativas de Oxigênio. Fotoquimioterapia. Ácido Zoledrônico.

FRANCISCON, J. P. S. **Effectiveness of active oxygen-releasing gel associated with antimicrobial photodynamic therapy as adjuvant therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws.** 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) is a pathological condition that is difficult to treat. Therefore, the ideal conduct is establishment of strategies aimed at preventing its occurrence. Topical therapy with active oxygen-releasing gel (TTAORG) and the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) have antimicrobial activity and biomodulation action, which makes them potential preventive strategies to MRONJ. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of TTAORG in association with aPDT in the alveolar repair in senescent female rats treated with oncological dose of zoledronate and to analyze its potentiation in preventing the occurrence of MRONJ. Twenty-eight senescent female rats were divided in four experimental groups: NLT, TTAORG, aPDT, TTAORG+aPDT. On 0 day a ligature was installed around the mandibular first molar on the left side to induce experimental periodontitis. From day 1 to 50, the rats received, every three days, 0.45 ml of zoledronate (100 µg/Kg), intraperitoneally. After three weeks of treatment with zoledronate, the mandibular first molar on the left side was extracted. In the NLT group (n=7) no local treatment was performed. In the TTAORG group (n=7) and in the aPDT group (n=7) the socket was submitted to three sessions of TTAORG and aPDT, respectively. In the TTAORG+aPDT group (n=7) the socket was submitted to three sessions of TTAORG followed by aPDT. Local treatments were performed at 0, 2 and 4 days after dental extraction. Euthanasia was performed 28 days after dental extraction. The hemimandibles were processed to allow: histological analysis, histometrical analysis of the percentage of newly formed bone tissue (NFBT) and non-vital bone tissue (NVBT) and immunohistochemical analysis (BMP2/4, morphogenetic bone protein 2/4 and; OCN, osteocalcin). The NLT group showed a great impairment of tissue repair process. The TTAORG, aPDT and TTAORG+aPDT groups showed a favorable tissue repair at the dental extraction site. In the NLT group, the percentage of NFBT was lower, while the percentage of NVBT was higher than the other groups. The TTAORG group showed lower percentage of NFBT and a higher percentage of

NVBT when compared with the aPDT and TTAORG+aPDT groups. In the TTAORG+aPDT group the percentage of NFBT was higher than aPDT group. The TTAORG+aPDT group showed the highest pattern of immunolabeling for BMP2/4 and OCN. TTAORG, aPDT and TTAORG+aPDT were able to avoid the occurrence of MRONJ after dental extraction with different levels of effectiveness. As a monotherapy, aPDT was better than TTAORG, but, the greatest effectiveness was obtained with the use of TTAORG+aPDT.

Keywords: Osteonecrosis. Reactive Oxygen Species. Photochemotherapy. Zoledronic Acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental e principais procedimentos operatórios.....	42
Figura 2 – Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatório.....	43
Figura 3 – Aspecto histológico do tecido ósseo adjacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatório.....	44
Figura 4 – TONF e TONV.....	45
Figura 5 – Padrão de imunomarcacão para BMP2/4 no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios.....	46
Figura 6 – Padrão de imunomarcacão para OCN no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatórios.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos durante o processo de reparação pós-extração dental em NTL, TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT aos 28 dias pós-operatórios.....	48
Tabela 2 – Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do padrão de estruturação tecidual durante o processo de reparação pós-extração dental em NTL, TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT aos 28 dias pós-operatórios.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

§	diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo aPDT
†	diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NTL
‡	diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TTGLOA
¹ FA	fotoantimicrobiano no estado singleto fundamental
¹ FA*	fotoantimicrobiano no estado singleto de excitação com vida curta
¹ O ₂	oxigênio singleto altamente reativo
³ FA*	fotoantimicrobiano no estado tripleto de excitação com vida longa
ANOVA	análise de variância
aPDT	terapia fotodinâmica antimicrobiana
BMP	proteína óssea morfogenética
DAMPS	padrões moleculares associados a danos
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
EROS	espécies reativas de oxigênio
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
HE	hematoxilina-eosina
IL1β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
IP	via de administração intraperitoneal
LBP	laser de baixa potência
LPS	lipopolissacarídeo
NTL	nenhum tratamento local
OCN	osteocalcina
ONMM	osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa
PAMPS	padrões celulares ligados a antígenos
PBS	tampão fosfato salino
PE	periodontite experimental
tc	tecido conjuntivo
TLR 2/4	toll like receptors 2/4
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
TONF	tecido ósseo neoformado
TONV	tecido ósseo não vital
TTGLOA	terapia tópica com gel liberador de oxigênio ativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Delineamento experimental	19
2.1.1 Protocolo de habituação dos animais.....	19
2.1.2 Anestesia.....	19
2.1.3 Instalação da ligadura.....	20
2.1.4 Protocolo medicamentoso com zoledronato.....	20
2.1.5 Grupos experimentais.....	20
2.1.6 Exodontia dos primeiros molares inferiores.....	21
2.1.7 Tratamento com TTGLOA (blue®m)	21
2.1.8 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT).....	21
2.1.9 Eutanásia e obtenção das amostras.....	22
2.1.10 Processamento histológico das amostras.....	22
2.1.11 Processamento imunoistoquímico das amostras.....	23
2.2 Análise dos dados	24
2.2.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico extra e intrabucal.....	24
2.2.2 Análises microscópicas.....	24
2.2.3 Análise histológica do sítio de extração dental e adjacências.....	24
2.2.4 Análise histométrica da TONF e da TONV.....	25
2.2.5 Análise imunoistoquímica de BMP2/4 e OCN.....	25
2.2.6 Análise estatística.....	25
3 RESULTADOS	27
3.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico do alvéolo.....	27
3.2 Análise histopatológica do sítio de extração dental.....	27
3.3 Porcentagem de TONF e de TONV	28
3.4 Padrão de imunomarcacão para BMP2/4 e OCN.....	28
4 DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
FIGURAS	42
TABELAS.....	48
ANEXOS.....	50

MANUSCRITO EM PORTUGUÊS PARA ENVIO À REVISTA
“PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY”¹

¹ <https://www.elsevier.com/journals/photodiagnosis-and-photodynamic-therapy/1572-1000/guide-for-authors>

Efetividade do gel liberador de oxigênio ativo associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana como tratamento preventivo para a osteonecrose dos maxilares induzida por medicamentos

João Paulo Soares Franciscon¹

Letícia Helena Theodoro²

Edilson Ervolino³

¹Aluno de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Odontologia (Área de Periodontia, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

²Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

³Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Edilson Ervolino

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Rodovia Marechal Rondon, s/n – Campus Universitário - SP, CEP: 16066-840.

Telefone: 55 (18) 3636-2801

e-mail: e.ervolino@unesp.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da terapia tópica com gel liberador de oxigênio ativo (TTGLOA) em associação com a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no processo de reparo alveolar de ratas senescentes tratadas com dose oncológica de zoledronato, e analisar o seu potencial na prevenção da ocorrência da osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM). Vinte e oito ratas senescentes foram divididas em quatro grupos experimentais: NTL, TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT. No dia 0 foi realizada a instalação de uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior do lado esquerdo para indução da periodontite experimental. Do dia 1 ao dia 50 as ratas receberam, a cada 3 dias, 0,45 ml de zoledronato (100 µg/Kg), pela via intraperitoneal. Após 3 semanas de tratamento com zoledronato foi efetuada a extração do primeiro molar inferior do lado esquerdo. No grupo NTL (n=7) não foi efetuado nenhum tratamento local. No grupo TTGLOA (n= 7) e no grupo aPDT (n=7), os alvéolos foram submetidos a três sessões de TTGLOA e aPDT, respectivamente. No grupo TTGLOA+aPDT (n=7) os alvéolos foram submetidos a três sessões de TTGLOA seguida de aPDT. Os tratamentos locais foram efetuados aos 0, 2 e 4 após exodontia. As eutanásias foram realizadas aos 28 dias pós exodontia. As hemimandíbulas foram devidamente processadas para permitir: análise histológica, análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) e de tecido ósseo não vital (TONV) e análise imunoistoquímica (BMP2/4, proteína morfogenética óssea 2/4 e; OCN, osteocalcina). O grupo NTL apresentou grande comprometimento do processo de reparação tecidual. Os grupos TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT apresentaram um processo de reparação tecidual favorável do sítio de extração dental. No grupo NTL a porcentagem de TONF foi menor, enquanto que, a porcentagem de TONV foi maior, que nos demais grupos. O grupo TTGLOA apresentou menor porcentagem de TONF e maior porcentagem de TONV quando comparado com os grupos aPDT e TTGLOA+aPDT. No grupo TTGLOA+aPDT a porcentagem de TONF foi maior que no grupo aPDT. O grupo TTGLOA+aPDT apresentou o maior padrão de imunomarcacão para BMP2/4 e para OCN. A TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT foram capazes de evitar a ocorrência da ONMM pós exodontia com diferentes níveis de efetividade. Como monoterapia, a aPDT foi superior a TTGLOA, todavia, a maior efetividade foi obtida com o emprego da TTGLOA+aPDT.

Palavras-chave: Osteonecrose. Espécies Reativas de Oxigênio. Fotoquimioterapia. Ácido Zoledrônico.

1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM) é uma reação adversa ocasionada por medicamentos com ação antirreabsortiva e/ou antiangiogênica. Esta condição patológica é definida por Ruggiero *et al.* (2022) como presença de osso exposto, ou osso que pode ser sondado através de fístula intra ou extra bucal, na região maxilofacial, que persiste sem reparação por um período maior do que oito semanas, em pacientes com tratamento prévio ou atual com drogas antirreabsortivas e/ou antiangiogênicas e sem histórico de radioterapia ou doença metastática nos maxilares. Por sua vez, Campisi *et al.* (2020) definem tal condição como uma reação adversa à medicamento, caracterizada por progressiva destruição e morte do osso que acomete a mandíbula e maxila de pacientes expostos ao tratamento com medicamentos conhecidos por aumentar o risco da doença, na ausência de um tratamento de radiação anterior, que deve ser diagnosticada e estadiada baseando-se em análise clínica e/ou radiográfica, independentemente da presença de osso necrótico exposto ou sondagem óssea através de tratos sinusais/fístulas por mais de oito semanas (CAMPISI *et al.*, 2020).

A incidência da ONMM é baixa em pacientes que usam a dosagem osteoporótica de drogas antirreabsortivas (< que 0,05%), todavia, tais medicamentos são utilizados por uma grande parcela da população para tal finalidade (RUGGIERO *et al.*, 2022). Em contrapartida, em pacientes que fazem uso da dosagem oncológica, ou seja, para complementação da terapia oncológica, a fim de evitar eventos relacionados ao esqueleto, a incidência da ONMM é mais elevada (< que 5%), e em tais pacientes este é um fator complicador, tendo em vista que pode atrapalhar sobremaneira o tratamento da doença de base (RUGGIERO *et al.*, 2022). A etiopatogenia da ONMM ainda não está totalmente elucidada. São apontados como fatores etiopatogênicos: a inibição da atividade reabsortiva dos osteoclastos, a qual provavelmente exerce um papel central; potente efeito antiangiogênico; ação citotóxica sobre os tecidos moles e; disfunção da resposta imunológica inata e adquirida (HE *et al.*, 2020; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019; AGHALOO; HAZBOUN; TETRADIS, 2015; BADEL *et al.*, 2013;).

A limitada compreensão da etiopatogenia, dificulta o tratamento, o qual

pode ser extremamente longo, se mostrar falho e deixar graves sequelas. A conduta clínica adotada para o tratamento tem se baseado no estadiamento da ONMM. Não há um protocolo padrão universalmente aceito, mas na maioria dos casos a terapia pode ser medicamentosa e/ou cirúrgica. A terapia medicamentosa consiste predominantemente no uso prolongado de agentes antimicrobianos. A terapia cirúrgica vai da conservadora à agressiva e consiste desde curetagem e/ou sequestrotomia até ressecção parcial dos maxilares (RUGGIERO et al., 2022; MADEIRA et al., 2020; KHAN *et al.*, 2016, 2017). Diante disso, a prevenção é a estratégia ideal em se tratando da ONMM. Atualmente, a conduta preventiva sugerida é a antibioticoterapia prolongada (KHAN et al., 2016, 2017; MADEIRA et al., 2020; RUGGIERO et al., 2022), no entanto, ela pode ser falha.

Estratégias mais efetivas para evitar a ocorrência da ONMM precisam ser exploradas com a finalidade de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) apresenta potente efeito antimicrobiano, elevada atividade biomodulatória e ausência de efeito adverso, o que a coloca como uma potencial forma de prevenir a ONMM. Na aPDT ocorre a interação entre luz, agente fotoantimicrobiano (FA) e oxigênio. O FA deve primeiramente interagir com células dos microrganismos, em seguida, sua irradiação por uma luz com um comprimento de onda ressonante a sua banda de absorção e, na presença do oxigênio, é capaz de promover a geração de elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). O FA, sob irradiação apropriada, muda de um nível de baixa energia (estado singleto fundamental, ^1FA) para um estado singleto de excitação com tempo de vida curta ($^1\text{FA}^*$), que pode ser convertido em um estado tripleto de excitação com tempo de vida longa ($^3\text{FA}^*$). Na presença de oxigênio o $^3\text{FA}^*$ é capaz de gerar EROs por dois mecanismos: via transferência de elétrons para formar predominantemente radicais superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (mecanismo tipo I) ou via transferência de energia para produzir oxigênio singleto altamente reativo ($^1\text{O}_2$) (mecanismo tipo II). Estes elevados níveis de EROs promovem a morte dos microrganismos via dano oxidativo (CARRERA et al., 2016; CIEPLIK et al., 2018; HAMBLIN, 2016; MAHMOUDI et al., 2018; WAINWRIGHT, 1998, 2019). Além da ação antimicrobiana, estudos mostram que a aPDT, quando emprega como fonte de luz o laser de baixa potência (LBP), também promove localmente efeitos

fotobiomodulatórios, tais como, modulação da resposta inflamatória, da angiogênese, da proliferação, da migração, da diferenciação e da atividade celular (DOMPE *et al.*, 2020), eventos essenciais para promoção da reparação tecidual. Nosso grupo e outros grupos de pesquisa tem demonstrado que a aPDT tem sido uma estratégia bem sucedida para prevenção da ONMM pós exodontia em ratos, uma vez que evita infecção, modula a inflamação local, estimula a reparação dos tecidos moles e duros e evita a necrose óssea (ERVOLINO *et al.*, 2019, ERVOLINO *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2022).

Uma outra estratégia que tem começado a ser explorada em outras áreas, em função de sua atividade antimicrobiana e cicatrizante, e que também poderia se constituir em uma outra alternativa para se evitar a ocorrência da ONMM é a terapia tópica com gel liberador de oxigênio ativo (TTGLOA), o blue®m. O gel liberador de oxigênio ativo é composto por perborato de sódio, peróxido de hidrogênio, glicose oxidase derivada do mel, xilitol e lactoferrina (DELIBERADOR *et al.*, 2020; MATTEI *et al.*, 2021). Quando tais componentes entram em contato com os fluidos teciduais, são convertidos lentamente em água oxigenada (0,003 a 0,15%), que por sua vez é degradada e convertida em água e oxigênio (GROOTVELD *et al.*, 2020). Tendo em vista que a suplementação de oxigênio é capaz de estimular da angiogênese, aumentar a proliferação celular, acelerar da formação de elementos da matriz extracelular e promover a morte de determinados tipos de bactérias (NGEOW *et al.*, 2022), o gel liberador de oxigênio ativo, que é um dos produtos comerciais capazes liberar a maior e mais prolongada quantidade de oxigênio, tem como principais ações a cicatrizante e a bactericida. Estudos *in vitro* e ensaios clínicos em humanos mostraram a TTGLOA tem sido capaz de promover a redução de bactérias e melhorar a reparação tecidual bucais (DELIBERADOR *et al.*, 2020; JULIANA; TAREK, 2022; MATTEI *et al.*, 2021; NGEOW *et al.*, 2022; SHIBLI *et al.*, 2021).

Até o presente momento não há estudos pré-clínicos que avaliaram o emprego da TTGLOA na ONMM. A hipótese do presente estudo é a TTGLOA empregada isoladamente, ou em associação com a aPDT seja capaz de melhorar o processo de reparação tecidual e evitar a ONMM pós exodontia em ratos. A justificativa principal para se associar a TTGLOA e a aPDT é avaliar se existe um

efeito sinérgico entre ambas, uma vez que além do oxigênio participar de inúmeros eventos que estimulam a reparação tecidual, a existência de um aporte maior de oxigênio durante a execução da aPDT poderia ser capaz de aumentar os efeitos fotodinâmicos. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi analisar a efetividade da TTGLOA em associação com a aPDT no processo de reparo alveolar em ratas senescentes tratadas com dose oncológica de zoledronato, e consequentemente, avaliar seu potencial na prevenção da ocorrência da ONMM.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizadas 28 ratas senescentes da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com peso corporal médio de 350 g no início do período experimental. As ratas foram obtidas no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA – UNESP) e posteriormente mantidas no Biotério de Experimentação da Disciplina de Histologia e Embriologia da FOA – UNESP sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (máximo de 4 animais por gaiola), onde tiveram livre acesso ao alimento e à água. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Guide to the care and use of experimental animals” (EMEST et al., 1993) e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP (Processo FOA nº 00196/2019).

2.1 Delineamento experimental

2.1.1 Protocolo de habituação dos animais

Todos os animais passaram por um período de habituação. A principal finalidade foi promover a sua familiarização com o ambiente e com o operador e minimizar o estresse provocado por algumas manobras pré-operatórias. Tal protocolo compreendeu os 14 dias que antecederam o início do delineamento dos grupos, sendo que neste período, a cada três dias, cada animal foi suavemente manuseado entre as mãos do operador durante um intervalo de 30 segundos, no qual regularmente foram aplicadas as manobras de restrição que simularam aquelas empregadas no protocolo medicamentoso.

2.1.2 Anestesia

Em todos os procedimentos experimentais com envolvimento de dor ou desconforto (instalação da ligadura, exodontia, aPDT, TTGLOA e eutanásia), os animais foram anestesiados, pela via injeção intramuscular, com uma associação de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompum, Bayer, RS, Brasil).

2.1.3 Instalação da ligadura

Um dia antes do início do protocolo medicamentoso foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24, Coats Corrente®, SP, Brasil), ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos de cada animal, com o intuito de promover o acúmulo de biofilme e, conseqüentemente, induzir a periodontite experimental (PE) (ERVOLINO et al., 2022; ERVOLINO et al., 2019; STATIKIEVICZ et al., 2018; TORO et al., 2019) (**FIGURA 1a, 1b**).

2.1.4 Protocolo medicamentoso com zoledronato

O plano de tratamento medicamentoso teve duração total de sete semanas (**FIGURA 1a**). A administração de zoledronato (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) ocorreu pela via intraperitoneal a cada três dias. A dose de zoledronato foi de 100 µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (ERVOLINO et al., 2019, 2022; STATKIEVICZ et al., 2018; TORO et al., 2019).

2.1.5 Grupos experimentais

Após a exodontia os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais: NTL, TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT. No grupo NTL (n=7) não foi efetuado nenhum tratamento local. No grupo TTGLOA (n= 7) os alvéolos foram tratados com três sessões de TTGLOA, blue®m (JM Holding Zwolle B.V, Overijssel, Holanda). No grupo aPDT (n=7), os alvéolos foram tratados com três sessões de aPDT. No grupo TTGLOA+aPDT (n=7), os alvéolos foram tratados com três sessões

de TTGLOA seguido de aPDT (**FIGURA 1a**).

2.1.6 Exodontia dos primeiros molares inferiores

Decorridas três semanas do protocolo medicamentoso, os animais foram posicionados em uma mesa de operação adaptada e as ligaduras de algodão foram removidas. Foi feita a antisepsia da cavidade oral com iodopovidona 10%, sindesmotomia (secção circunferencial das fibras gengivais supra-crestais), luxação e exodontia dos primeiros molares inferiores esquerdo de cada animal com a utilização de instrumentos odontológicos adaptados (ERVOLINO *et al.*, 2019, 2022; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019). (**FIGURA 1a,1c, 1d**).

2.1.7 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

A aPDT foi realizada aos 0, 2 e 4 dias pós exodontia, totalizando 3 sessões. Foi efetuada a deposição de 0,1 ml do agente fotoantimicrobiano azul de metileno (Farmácia Apothicário, Araçatuba, SP, Brazil) na concentração de 100 µg/ml foi depositado no interior dos alvéolos dos primeiros molares inferiores, o qual permaneceu por sessenta segundos. Em seguida foi realizada a irradiação com laser de InGaAlP ($600 \pm 10\text{nm}$, THERA LASE®, D.M.C. Equipamentos Ltda®, São Carlos, SP, Brasil) nos seguintes parâmetros: potência - 35 mW; modo de operação - laser contínuo; diâmetro do spot - $0,0283\text{ cm}^2$; modo de aplicação – contato pontual; energia - 2,1 J/ponto; quantidade de pontos de aplicação - 1; tempo de exposição - 60s; densidade energética por ponto - $74,2\text{ J/cm}^2$; irradiância - $1,23\text{ W/cm}^2$. O laser foi aplicado no centro dos alvéolos, em contato com os mesmos e posicionado paralelamente ao seu longo eixo (ERVOLINO *et al.*, 2019) (**FIGURA 1a, 1f, 1g**).

2.1.8 Tratamento com TTGLOA (blue®m)

A TTGLOA consistiu na deposição de 0,3mL do gel no interior dos alvéolos dentais nos dias 0, 2 e 4 após a exodontia, totalizando 3 sessões. Essa quantidade

do gel permaneceu em contato com os tecidos em um período de três minutos, logo após, apenas o seu excesso foi removido. No grupo TTGLOA+aPDT a aplicação foi efetuada da mesma maneira do grupo TTGLOA e, uma vez concluída, foi realizada a aPDT, como descrito acima (**FIGURA 1a, 1e**).

2.1.9 Eutanásia e obtenção das amostras

Concluído o protocolo experimental, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução 0,9% de cloreto de sódio acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml), constituída de 4% de formaldeído (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA), 0,1 M, 4°C, pH 7,4. As hemi-mandíbulas foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora durante 72 horas para os devidos processamentos laboratoriais subsequentes (ERVOLINO *et al.*, 2019, 2022; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019).

2.1.10 Processamento histológico das amostras

As hemi-mandíbulas foram submetidas à lavagem em água corrente por um período de 24 horas e a seguir imersas em solução desmineralizadora (constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etileno diamino tetra-acético – EDTA, durante 60 dias). Após a desmineralização, essas peças foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas, impregnadas, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. A microtomia foi executada seguindo um plano de corte sagital, da face vestibular para lingual. As secções histológicas contendo as lojas anteriormente ocupadas pelas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior esquerdo foram coletadas em lâmina histológica.

Para a análise histopatológica da reparação tecidual e análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) e porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV), as secções histológicas foram submetidas à coloração pela

hematoxilina-eosina (HE).

2.1.11 Processamento imunoistoquímico das amostras

Para as análises imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados pelo xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato 10 mM e pH 6,0 (Spring Bioscience), em câmara pressurizada (Decloaking Chamber®, Biocare Medical) a 95°C. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M e pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução constituída de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS, por 1 hora, e em solução constituída de 4% de leite em pó desnatado em PBS, também por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase e da biotina endógenas, respectivamente. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado em solução constituída de 1,5% de soro albumina bovino em PBS acrescido de 0,05% de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich), durante 12 horas. As lâminas contendo as amostras de cada grupo experimental foram divididas em 2 lotes, e cada lote foi incubado, por 24 horas, com um dos seguintes anticorpos primários: anti-proteína morfogenética óssea 2/4 (BMP2/4) (Santa Cruz Laboratories) e anti-osteocalcina (OCN) (Santa Cruz Laboratories). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado (Vector Laboratories), por 2 horas e, subsequentemente, tratados com estreptavidina conjugada à peroxidase da raiz forte (Vector Laboratories), por 2 horas. A revelação foi realizada utilizando-se como cromógeno o composto 3,3'-diaminobenzidina (Vector Laboratories). Os espécimes foram submetidos à contracoloração com Hematoxilina de Harris, em seguida, foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e recobertos com meio de montagem e lamínulas de vidro.

Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se apenas a utilização do anticorpo primário. Todas as etapas da reação imunoistoquímica foram baseadas no protocolo descrito por Ervolino et al. (2019).

2.2 Análise dos dados

2.2.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico extra e intrabucal

Durante todo o período experimental, a condição geral de saúde dos animais foi observada. Após a eutanásia, foi realizada inspeção visual da condição extra e intrabucal dos animais (ERVOLINO *et al.*, 2019, 2022; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019).

2.2.2 Análises microscópicas

Para as análises histopatológica, histométrica e imunoistoquímica foram utilizadas três secções histológicas situadas na porção vestibular, média e lingual do alvéolo dental do lado esquerdo. A região de interesse consistiu-se de uma área de 4 mm x 4 mm que englobava a porção do alvéolo anteriormente ocupado pela raiz mesial e pela raiz distal do primeiro molar inferior esquerdo e suas adjacências. O seu limite distal consistiu de uma linha situada paralelamente a superfície da dentina coronária e radicular do segundo molar inferior esquerdo, a partir da qual se estendia para a mesial por 4 mm. O seu limite coronário consistiu de uma linha situada paralelamente ao limite amelo-cementário do segundo molar inferior esquerdo, a partir da qual se estendia para apical por 4 mm (ERVOLINO *et al.*, 2019, 2022; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019).

As análises microscópicas foram efetuadas por um histologista certificado, previamente calibrado e cego aos tratamentos.

2.2.3 Análise histológica do sítio de extração dental e adjacências

Os parâmetros avaliados, através de microscopia óptica, na região de interesse, foram os seguintes: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2)

extensão do processo inflamatório; 3) padrão de celularidade e de estruturação do tecido epitelial; 4) padrão de celularidade e de estruturação do tecido conjuntivo; 5) padrão de celularidade e de estruturação do tecido ósseo (ERVOLINO *et al.*, 2019, 2022; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019).

2.2.4 Análise histométrica da TONF e da TONV

Na região de interesse foram capturadas as imagens utilizando-se câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Axiovision 4.8.2®, Carl Zeiss), foi mensurada a quantidade total de tecido ósseo, e, em seguida, foi calculada a porcentagem de TONF e a porcentagem de TONV (ERVOLINO *et al.*, 2019, 2022; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019). O TONV consistiu das regiões onde mais de dez lacunas adjacentes se apresentavam vazias ou contendo restos necróticos de osteócitos.

2.2.5 Análise imunoistoquímica de BMP2/4 e OCN

Para análises imunoistoquímicas, um histologista cego aos tratamentos atribuiu um escore de 0 a 3 de acordo com a intensidade da marcação para cada um dos espécimes. Os valores foram expressos como mediana $\pm$ desvio interquartis. Para BMP2/4 e OCN foi analisada toda a área da mandíbula que continha o sítio de extração dental, compreendendo a mesma região que foi efetuada a análise histopatológica. Nesta região foi efetuada uma análise semi-quantitativa do padrão de imunomarcação para BMP2/4 e OCN, onde: ESCORE 0, imunomarcação nula, ausência de células imunorreativas e ausência de imunomarcação na matriz extracelular; ESCORE 1, baixo padrão de imunomarcação, aproximadamente 20% das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular; ESCORE 2, moderado padrão de imunomarcação, aproximadamente 40% das células imunorreativas e fraca marcação na matriz extracelular, ESCORE 3, alto padrão de imunomarcação, aproximadamente 60% das células imunorreativas e moderada ou forte marcação na matriz extracelular.

2.2.5 Análise estatística

Empregou-se o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). Para a análise histopatológica e para as análises imunoistoquímicas foram empregados os testes de Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Para a análise histométrica da porcentagem de TONF e TONV foram empregados os testes de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Análise da condição geral de saúde e exame clínico do alvéolo

As condições gerais e o peso corporal dos animais dos grupos TTGLOA, aPDT e aPDT+TTGLOA se mantiveram dentro de um padrão de normalidade e constantes durante todo o período experimental. Os animais do grupo NTL apresentaram uma leve diminuição no peso corporal, especialmente após a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo, a qual se manteve até o final do período experimental.

Ao exame clínico intrabucal, NTL apresentou uma loja cirúrgica mais ampla que nos demais grupos experimentais, cuja mucosa sobrejacente não se reconstituiu. Em alguns espécimes deste grupo havia exposição óssea e ampliação ainda maior do sítio de extração. Nos grupos TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT houve reparação completa, ou quase completa, do sítio de extração dental, com uma loja cirúrgica bem menor e recoberta total ou parcialmente por tecidos moles.

3.2 Análise histopatológica do sítio de extração dental

O grupo NTL apresentou um grande comprometimento do processo de reparação tecidual, apresentando características histológicas condizentes com um quadro de ONMM. Os grupos aPDT e aPDT+TTGLOA apresentaram um processo de reparação tecidual mais favorável do sítio de extração dental e mucosa sobrejacente. O grupo TTGLOA não se mostrou similar ao grupo NTL, ou seja, o quadro não se mostrou condizente com ONMM, no entanto, a reparação tecidual ficou aquém do nível observado nos grupos aPDT e aPDT+TTGLOA. Os parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos e do padrão de estruturação dos tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo estão apresentados na **TABELA 1** e na **TABELA 2**, respectivamente. O aspecto histológico do sítio de extração dental e de suas adjacências em NTL, TTGLOA, aPDT e aPDT+TTGLOA aos 28 dias pós-operatórios, estão evidenciados nas **FIGURA 2** e **FIGURA 3**.

3.3 Porcentagem de TONF e de TONV

No grupo NTL a porcentagem de TONF foi menor que nos demais grupos experimentais. O grupo TTGLOA apresentou menor porcentagem de TONF quando comparado com os grupos aPDT e TTGLOA+aPDT. No grupo TTGLOA+aPDT a porcentagem de TONF foi maior que no grupo aPDT (**FIGURA 2 e FIGURA 4**).

No grupo NTL a porcentagem de TONV foi maior que nos demais grupos experimentais. O grupo TTGLOA apresentou maior porcentagem de TONV quando comparado com os grupos aPDT e TTGLOA+aPDT. Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de TONV entre os grupos aPDT e TTGLOA+aPDT (**FIGURA 3 e FIGURA 4**).

3.4 Padrão de imunomarcção para BMP2/4 e OCN

O padrão de imunomarcção para BMP2/4 no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada na **FIGURA 5**. A mediana e o desvio interquartis foi: 1 (0 – 1), prevalecendo um baixo padrão de imunomarcção, no grupo NTL; 2 (2 – 2), prevalecendo um moderado padrão de imunomarcção, no grupo TTGLOA; 3 (2 – 3), prevalecendo um alto padrão de imunomarcção, no grupo aPDT; 3 (2 – 3), prevalecendo um alto padrão de imunomarcção, no grupo TTGLOA+aPDT.

O grupo NTL apresentou um padrão de imunomarcção para BMP2/4 menor que os demais grupos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significativa no padrão de imunomarcção para BMP2/4 entre os grupos TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT.

O padrão de imunomarcção para OCN no sítio de extração dental nos diferentes grupos experimentais está apresentada na **FIGURA 6**. A mediana e o desvio interquartis foi: 1 (0 – 1), prevalecendo um baixo padrão de imunomarcção, no grupo NTL; 2 (1 – 2), prevalecendo um moderado padrão de imunomarcção, no grupo TTGLOA; 3 (2 – 3), prevalecendo um alto padrão de imunomarcção, no grupo aPDT; 3 (2 – 3), prevalecendo um alto padrão de imunomarcção, no grupo TTGLOA+aPDT.

O grupo NTL apresentou um padrão de imunomarcção para OCN menor

que o apresentado pelos grupos aPDT e TTGLOA+aPDT. O grupo TTGLOA+aPDT apresentou um padrão de imunomarcção para OCN maior que o grupo TTGLOA. Quando os grupos NTL e TTGLOA são comparados entre si não se constatou diferença estatisticamente significativa na imunomarcção para OCN. Também não houve diferença estatisticamente significativa no padrão de imunomarcção para OCN entre os grupos aPDT e TTGLOA+aPDT.

4 DISCUSSÃO

Com a elevação na expectativa de vida da população mundial, o uso dos medicamentos antirreabsortivos tem aumentado expressivamente, uma vez que são empregados para tratamento de doenças mais comuns na terceira idade (DRAKE, 2008; MACEDO *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2016). Devido a este fato, os cirurgiões-dentistas tendem a atender com cada vez mais frequência esta população, a qual está sujeita a um efeito adverso ocasionado por tais medicamentos que é a ONMM (RUGGIERO *et al.*, 2022). O presente estudo teve como objetivo analisar a efetividade da TTGLOA em associação com a aPDT no processo de reparo alveolar em ratas senescentes tratadas com dose oncológica de zoledronato, e consequentemente, avaliar seu potencial na prevenção da ocorrência da ONMM. O emprego da A TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT foram capazes de evitar a ocorrência da ONMM pós exodontia com diferentes níveis de efetividade.

Os modelos experimentais em animais ajudam a compreender a etiopatogenia da ONMM e, além disso, permitem que propostas de tratamento que visam a sua prevenção ou sua resolução (AGUIRRE; CASTILLO; KIMMEL, 2021), possam ser devidamente avaliadas concomitantemente ao nível celular, tecidual e clínico. No presente estudo optamos pela utilização de um modelo experimental caracterizado por nosso grupo de pesquisa (ERVOLINO *et al.*, 2019, 2022; STATKIEVICZ *et al.*, 2018; TORO *et al.*, 2019), o qual se baseou nos fatores de risco da ONMM (HALLMER *et al.*, 2018; KUROSHIMA; MCGOWAN; MCGOWAN; IVANOVSKI, 2018; OTTO *et al.*, 2012; SASAKI; SAWASE, 2019). No que se refere à droga, constata-se que quanto mais potente a ação antirreabsortiva, quanto maior a dosagem e duração do tratamento, maior é o risco de ocorrência da ONMM (HALLMER *et al.*, 2018; (HALLMER *et al.*, 2018; KUROSHIMA; MCGOWAN; MCGOWAN; IVANOVSKI, 2018; OTTO *et al.*, 2012; SASAKI; SAWASE, 2019), em sendo assim, optamos pelo uso do zoledronato, o mais potente dos bisfosfonatos, na dosagem oncológica, e por um período relativamente longo, em se tratando do rato. Entre os fatores relacionados ao paciente, a idade avançada e o sexo feminino estão entre os principais fatores de riscos, diante disso, optamos por utilizar ratas senescentes (HALLMER *et al.*, 2018; KUROSHIMA; MCGOWAN; MCGOWAN;

IVANOVSKI, 2018; OTTO et al., 2012; SASAKI; SAWASE, 2019). Com relação aos fatores locais, as cirurgias dento-alveolares estão entre os principais fatores predisponentes (62% – 82% dos casos ONMM), especialmente quando há comprometimento de natureza inflamatório-infecciosa associado ao dente (HALLMER et al., 2018; KUROSHIMA; MCGOWAN; MCGOWAN; IVANOVSKI, 2018; OTTO et al., 2012; SASAKI; SAWASE, 2019), em função disso, optamos pela instalação da ligadura no primeiro molar inferior do lado esquerdo, para que o acúmulo de placa induzisse uma periodontite experimental e, na sequência, este dente foi extraído. Com o emprego deste modelo experimental o grupo NTL desenvolveu um quadro semelhante a ONMM aos 28 dias pós extração dental.

No presente estudo foi constatado que o emprego exclusivamente da aPDT e o TTGLOA associado com a aPDT se mostraram as terapias preventivas mais efetivas para estimular o processo de reparação alveolar e evitar a ocorrência de ONMM pós-exodontia. Ambos tratamentos preventivos foram capazes de modular a resposta inflamatória local, promover a regeneração epitelial, melhorar a reparação do tecido conjuntivo, estimular a neoformação óssea alveolar e evitar a infecção local. Além disso, as duas propostas preventivas foram capazes de manter baixas porcentagens de TONV no sítio de extração dental e em suas adjacências, uma característica histológica indesejada, e muito comum, constatada no tecido ósseo sob influência do tratamento com medicamentos com potente ação antirreabsortiva. No grupo que recebeu exclusivamente a TTGLOA foi constatado que, embora o quadro inflamatório e o padrão de celularidade dos tecidos moles tenham se mostrado melhores que os apresentados pelo grupo NTL, tais resultados não diferiram estatisticamente, no entanto, o significado biológico desta melhora se traduziu em maior porcentagem de TONF, maior imunomarcacão para BMP2/4 e menor porcentagem de TONV, o que consideramos de extrema importância em se tratando de ONMM. Isso nos faz acreditar que o uso da TTGLOA foi capaz de exercer efeitos locais muito positivos, todavia, com efetividade menor que as outras duas opções de prevenção avaliadas neste estudo.

Os achados do presente estudo no que se refere aos resultados obtidos nos grupos aPDT e TTGLOA+aPDT corroboram estudos prévios utilizando as

condições e modelo experimentais similares, nos quais os mesmos parâmetros de irradiação foram empregados, no entanto, utilizando-se de diferentes agentes FA na aPDT, o azul de metileno (ERVOLINO *et al.*, 2019) e o butil azul de toluidina (ERVOLINO *et al.*, 2022). Os achados do presente estudo e de outros estudos pré-clínicos apenas reforçam o quão a utilização da aPDT é capaz de assegurar a reparação alveolar e prevenir a ONMM. Além disso, um parâmetro de grande importância avaliado no presente estudo, a porcentagem de TONF, foi maior no grupo TTGLOA+aPDT que no grupo aPDT, o que demonstra que o efeito positivo da aPDT foi melhorado com sua associação com a TTGLOA, ou seja, houve um efeito sinérgico das duas terapias neste parâmetro. Nos últimos anos o emprego da aPDT tem a se tornar uma realidade na clínica odontológica para prevenir a ONMM. Nosso grupo (ERVOLINO *et al.*, 2021) e outros grupos de pesquisa (POLI *et al.*, 2018, 2019; TARTAROTI *et al.*, 2020) obtiveram resultados positivos com o uso da aPDT como terapia preventiva para evitar a ocorrência de ONMM em pacientes com risco para a doença.

Como mencionado anteriormente, um dos parâmetros avaliados no presente estudo, a porcentagem de TONV, é de fundamental importância por caracterizar as lesões semelhantes a ONMM em ratos. Ao se observar os resultados da análise histopatológica e relacioná-los com a análise histométrica da porcentagem de TONV, chegamos à conclusão de que quanto maior a magnitude da resposta inflamatória local, mais elevados são os níveis de TONV nas adjacências do sítio de extração dental. Além disso, acreditamos que a lesão semelhante a ONMM em ratos se manifeste clinicamente, ou seja, com osso exposto, dependendo da porcentagem de TONV presente, tendo em vista que os ratos que apresentaram a manifestação clínica da ONMM, ou seja, exibiram osso exposto, foram aqueles apresentavam a maiores porcentagem de TONV. Nos grupos aPDT e TTGLOA+aPDT constatou-se um controle da inflamação, conseqüentemente, foram observados menores porcentagens de TONV. Em TTGLOA ocorreu uma redução da inflamação, a qual, embora não tenha se mostrado estatisticamente menor que a apresentada pelo grupo NTL, do ponto de vista biológico, é incontestável que estava menos exacerbada, ou seja, mais controlada que neste grupo, e o reflexo disso foi a redução na porcentagem de TONV. Nosso achados mostram que ocorreu um controle da inflamação com as

terapias empregadas, cuja magnitude foi muito maior nos grupos aPDT e TTGLOA+aPDT.

Nossos achados no que se refere a inflamação, estão de acordo com estudos que mostraram níveis elevados de citocinas com ação pró-inflamatórias parecem estar fortemente associados com a ocorrência de ONMM em modelos experimentais (ERVOLINO *et al.*, 2019; FUNAYAMA *et al.*, 2019; MORITA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2015; SOMA *et al.*, 2021). Morita *et al.* (2017) demonstraram que camundongos nocaute para as principais citocinas com atividade pró-inflamatório (TNF α , IL1 β e IL-6) são resistentes ao surgimento de lesões semelhantes à ONMM, mesmo com a administração de alta dosagem de bisfosfonatos. Tal estudo destaca que os elevados níveis de inflamação local e sistêmica, associados com a inibição da atividade dos osteoclastos, induzida pelo zoledronato, estimula a conversão de células precursoras de osteoclastos em macrófagos, os quais secretam níveis ainda maiores de citocinas com ação inflamatórias (MORITA *et al.*, 2017; SOMA *et al.*, 2021). Tem sido mostrado que o zoledronato interfere com a polarização de macrófagos (ZHU *et al.*, 2019), ou seja, este medicamento aumenta a polarização para macrófagos M1, os quais apresentam ação pró-inflamatórias, e reduz a polarização para macrófagos M2, os quais apresentam com ação anti-inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2021).

Um outro ponto importante que relaciona a inflamação local exacerbada exercendo efeitos negativos sobre o tecido ósseo adjacente está relacionada com a ativação da necroptose em osteócitos, um tipo de morte celular programada, desencadeada por padrões celulares ligados a antígenos (PAMPs), lipopolissacarídeos (LPS), DNAs danificado, entre outras moléculas. Neste tipo de morte celular ocorre o rompimento da membrana celular e o extravasamento de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) na matriz extracelular. Os DAMPs desencadeiam eventos inflamatórios secundários, gerando um mecanismo de retroalimentação que exacerba ainda mais o quadro inflamatório, uma vez que, essas células estão aprisionadas de forma isolada na matriz óssea, impossibilitando a ação imediata das células clásticas (AGUIRRE; CASTILLO; KIMMEL, 2021). Esse estudo reforça ainda mais o que foi mencionamos anteriormente, a modulação da inflamação, observado principalmente nos grupos aPDT e TTGLOA+aPDT, reduz grandemente a

porcentagem de TONV, ou seja, evita a ocorrência da ONMM.

Um aspecto que também deve ser considerado no presente estudo são os efeitos do zoledronato e das terapias avaliadas sobre os osteoblastos. Huang *et al.* (2015) demonstraram que o zoledronato inibe, de modo dose-dependente, a expressão de colágeno tipo I, fosfatase alcalina e OCN em osteoblastos. Além disso, esse estudo também mostrou que o zoledronato diminui a diferenciação de células precursoras em osteoblastos por reduzir a expressão de proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2). Da mesma forma, outros estudos mostram que o uso do zoledronato exerce efeitos negativos sobre a proliferação, a maturação e expressão de proteínas em células da linhagem osteoblástica (BASSO *et al.*, 2014; FROMIGUÉ; BODY, 2002). Tais efeitos sobre os negativos sobre os osteoblastos explicaria os nossos achados no grupo NTL. Além disso, constatamos que as terapias empregadas foram capazes de minimizar a ação negativa do zoledronato sobre os osteoblastos, uma vez que, a análise histopatológica do padrão de celularidade do tecido ósseo, a análise histométrica da porcentagem de TONF e o padrão de imunomarcacão para BMP2/4 foram maiores em TTGLOA, que por sua vez foram maiores em aPDT e que, por fim, foram ainda maiores em TTGLOA+aPDT, sendo que estes últimos grupos também se observou uma maior imunomarcacão para OCN.

O uso exclusivamente de TTGLOA não se mostrou com a mesma efetividade que a aPDT ou TTGLOA+aPDT, no entanto, a sua associaçãõ com esta terapia foi capaz de melhorar a formaçãõ de tecido ósseo no sítio de extraçãõ dental. Diante disso, acreditamos que o aporte adicional de oxigênio gerado pela terapia tenha exercido efeito positivo sobre os osteoblastos. No grupo aPDT, tendo em vista que a luz utilizada foi o laser de baixa potência, com parâmetros que estimulam a reparaçãõ tecidual, acreditamos que o efeito fotoestimulatório sobre os osteoblastos (DOMPE *et al.*, 2020) tenha sido o responsável pelos efeitos observados. Por fim, no grupo TTGLOA+aPDT, onde o aporte de oxigênio foi maior, em funçãõ da TTGLOA, e o efeito fotoestimulatório do laser empregado na aPDT sobre os osteoblastos, em uma situaçãõ de melhor oxigenaçãõ tecidual, resultou no maior nível de TONF, de BMP2/4 e OCN no sítio de extraçãõ dental.

No presente estudo não foi efetuada uma acurada análise microbiológica,

todavia, este é um ponto que não pode ser desconsiderado. O uso do zoledronato, além de provocar alterações na microbiota bucal (PUSHALKAR *et al.*, 2014), também torna o ambiente mais susceptível a infecção (AGHALOO; BADEL *et al.*, 2013; HAZBOUN; HE *et al.*, 2020; KUROSHIMA; SASAKI; SAWASE, 2019; TETRADIS, 2015). A presença da infecção compromete a reparação tecidual, o que se constatou no grupo NTL, onde colônias de bactérias foram observadas sobre o tecido ósseo não vital presente em grande quantidade neste grupo experimental. Diante disso, deve ser considerado que todas as terapias, com diferentes níveis de efetividade, foram capazes de evitar a infecção local, inclusive a TTGLOA, o que corrobora com estudo anterior em outra situação de caráter inflamatório/infeccioso (SHIBLI *et al.*, 2021). O efeito antimicrobiano da aPDT é extremamente potente (CARRERA *et al.*, 2016; CIEPLIK *et al.*, 2018; HAMBLIN, 2016; MAHMOUDI *et al.*, 2018; WAINWRIGHT, 1998, 2019), sendo assim, ao impedir que ocorra a infecção e ainda exercendo efeito estimulatório sobre o tecido explicaria os melhores resultados no que se refere à reparação tecidual observados nos grupos aPDT e TTGLOA+aPDT. No entanto, estudos microbiológicos mais aprofundados são necessários para alicerçar nossas especulações.

O resultado do tratamento da ONMM não é apenas imprevisível, mas também, frequentemente, é problemático. A prevenção é o ideal quando se refere a esta condição. Os achados deste estudo, levando-se em consideração as limitações de um estudo em animais, indicam que a aPDT se mostra uma estratégia efetiva de prevenção da ONMM, inclusive constatou-se que sua associação com a TTGLOA houve uma potencialização de seus efeitos positivos. Sendo assim, o presente estudo se constitui em um norteador para futuros estudos clínicos controlados e randomizados envolvendo a prevenção da ONMM via emprego da aPDT e TTGLOA. Estudos clínicos que visam estabelecer protocolos preventivos efetivos para pacientes que fizeram ou fazem uso de drogas com ação antirreabsortiva e que necessitam de intervenções odontológicas invasivas são necessários.

5 CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, foi possível concluir que TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT foram capazes de evitar a ocorrência da ONMM pós exodontia com diferentes níveis de efetividade. Como monoterapia, a aPDT foi superior a TTGLOA, todavia, a maior efetividade foi obtida com o emprego da TTGLOA+aPDT.

REFERÊNCIAS

- AGHALOO, T.; HAZBOUN, R.; TETRADIS, S. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, v. 27, n. 4, p. 489-496, nov. 2015. DOI: 10.1016/j.coms.2015.06.001.
- AGUIRRE, J. I.; CASTILLO, E. J.; KIMMEL, D. B. Biologic and pathologic aspects of osteocytes in the setting of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). **Bone**, v. 153, p. 116168, dez. 2021. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116168.
- BADEL, T. *et al.* Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. **Coll. Antropol.**, v. 37, n. 2, p. 645-651, jun. 2013.
- BASSO, F. G. *et al.* Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. **Support Care Cancer**, v. 22, n. 10, p. 2741-2748, maio 2014. DOI: 10.1007/s00520-014-2267-3.
- CAMPISI, G. *et al.* Medication-Related Osteonecrosis of Jaws (MRONJ) Prevention and Diagnosis: Italian Consensus Update 2020. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 17, n. 16, p. 5998, ago. 2020. DOI: 10.3390/ijerph17165998.
- CARRERA, E. T. *et al.* The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. **Laser Phys.**, v. 26, n. 12, p. 123001, nov. 2016. DOI: 10.1088/1054-660X/26/12/123001.
- CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 571-589, maio 2018. DOI: 10.1080/1040841X.2018.1467876.
- DELIBERADOR, T. M. *et al.* Comparative analysis in vitro of the application of blue@m oral gel versus chlorhexidine on porphyromonas gingivalis: a pilot study. **Adv Microbiol.**, v. 10, n. 4, p. 194-201, abr. 2020. DOI: 10.4236/aim.2020.104015.
- DOMPE, C. *et al.* Photobiomodulation-underlying mechanism and clinical applications. **J. Clin. Med.**, v. 9, n. 6, p. 1724, jun. 2020. DOI: 10.3390/jcm9061724.
- DRAKE, M. T. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin. Proc.**, v. 83, n. 9, p. 1032-1045, set. 2008. DOI: 10.4065/83.9.1032.
- EMEST, D. *et al.* Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Conuncil on Animal Care., v. 1, p. 1-298, abr. 1993. ISBN: 0-919087-18-3
- ERVOLINO, E. *et al.* Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy mediated by butyl toluidine blue in preventing medication-related osteonecrosis of the jaws in rats.

Photodiagnosis Photodyn. Ther., n. 40 p. 103172 out. 2022. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2022.103172.

ERVOLINO, E. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. **Bone**, v. 120, p. 101-113, out. 2019. DOI: 10.1016/j.bone.2018.10.014.

ERVOLINO, E. *et al.* Terapia fotodinâmica antimicrobiana aplicada às condições patológicas ósseas com envolvimento de infecção. *In*: GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H. **Lasers na odontologia: uma visão clínica baseada em evidências científicas**. São Paulo: Santos, 2021. p. 273-286.

FROMIGUÉ, O.; BODY, J.J. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 25, n. 6, p. 539-546, jun. 2002. DOI: 10.1007/BF03345497.

FUNAYAMA, H. *et al.* Effects of zoledronate on local and systemic production of IL-1 β , IL-18, and TNF- α in mice and augmentation by lipopolysaccharide. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 42, n. 6, p. 929-936, jun. 2019. DOI: 10.1248/bpb.b18-00923.

GROOTVELD, M. *et al.* Potential advantages of peroxoborates and their ester adducts over hydrogen peroxide as therapeutic agents in oral healthcare products: chemical/biochemical reactivity considerations in vitro, ex vivo and in vivo. **Dent. J.**, v. 8, n. 3, p. 89, ago. 2020. DOI: 10.3390/dj8030089.

HALLMER, F. *et al.* Prevalence, initiating factor, and treatment outcome of medication-related osteonecrosis of the jaw-a 4-year prospective study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 126, n. 6, p. 477-485, ago. 2018. DOI: 10.1016/j.oooo.2018.08.015.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 33, p. 67-73, jul. 2016. DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.008.

HE, L. *et al.* Pathogenesis and multidisciplinary management of medication-related osteonecrosis of the jaw. **Int. J. Oral Sci.**, v. 12, n. 1, p. 30, out. 2020. DOI: 10.1038/s41368-020-00093-2.

HUANG, K. C. *et al.* The effects of zoledronate on the survival and function of human osteoblast-like cells. **BMC Musculoskelet. Disord.**, v. 16, p. 355, nov. 2015. DOI: 10.1186/s12891-015-0818-5.

JULIANA, H.; TAREK, S. Comparative study of the effect of BlueM active oxygen gel and coe-pack dressing on postoperative surgical depigmentation healing. **Saudi Dent. J.**, v. 34, n. 4, p. 328-334, abr. 2022. DOI: 10.1016/j.sdentj.2022.04.005.

KHAN, A. *et al.* Osteonecrosis of the jaw (ONJ): diagnosis and management in 2015. **Osteoporos. Int.**, v. 27, n. 3, p. 853-859, out. 2016. DOI: 10.1007/s00198-015-3335-3.

KHAN, A. A. *et al.* Case-based review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and application of the international recommendations for management from the international task force on ONJ. **J. Clin. Densitom.**, v. 20, n. 1, p. 8-24, 2017. DOI: 10.1016/j.jocd.2016.09.005.

KUROSHIMA, S.; SASAKI, M.; SAWASE T. Medication-related osteonecrosis of the jaw: a literature review. **J. Oral Biosci.**, v. 61, n. 2, p. 99-104, maio 2019. DOI: 10.1016/j.job.2019.03.005.

MACEDO, F. *et al.* Bone metastases: an overview. **Oncol. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 321, maio 2017. DOI: 10.4081/oncol.2017.321.

MADEIRA, M. *et al.* Prevention and treatment of oral adverse effects of antiresorptive medications for osteoporosis - A position paper of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM), Brazilian Society of Stomatology and Oral Pathology (Sobep), and Brazilian Association for Bone Evaluation and Osteometabolism (Abrasso). **Arch. Endocrinol. Metab.**, v. 64, n. 6, p. 2359-3397, out. 2020. DOI: 10.20945/2359-3997000000301.

MAHMOUDI, H. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control bacterial infections. **J. Lasers Med. Sci.**, v. 9, n. 3, p. 154-160, jul. 2018. DOI: 10.15171/jlms.2018.29.

MATTEI, B. M. *et al.* Mouthwash with active oxygen (blue®m) reduces postoperative inflammation and pain. **Case Rep Dent.**, v. 2021, p. 5535807, maio 2021. DOI: 10.1155/2021/5535807.

MCGOWAN, K.; MCGOWAN, T.; IVANOVSKI, S. Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: a systematic review. **Oral Dis.**, v. 24, n. 4, p. 527-536, ago. 2018. DOI: 10.1111/odi.12708.

MORITA, M. *et al.* Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 46322, abr. 2017. DOI: 10.1038/srep46322.

NGEOW, W. C. *et al.* A narrative review on means to promote oxygenation and angiogenesis in oral wound healing. **Bioengineering**, v. 9, p. 636-655, nov. 2022. DOI: 10.3390/bioengineering9110636.

OTTO, S. *et al.* Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 40, n. 4, p. 303-309, jun. 2012. DOI: 10.1016/j.jcms.2011.05.003.

POLI, P. P. *et al.* Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in the prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw following dentoalveolar surgery: a case series. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 27, p. 117-123, maio 2019. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.037.

POLI, P. P. *et al.* Adjunctive use of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: a case report. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 23, p. 99-101, jun. 2018. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.06.004.

PUSHALKAR, S. *et al.* Oral microbiota and host innate immune response in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Int. J. Oral Sci.**, v. 6, n. 4, p. 219-226, ago. 2014. DOI: 10.1038/ijos.2014.46.

RUGGIERO, S. L. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 80, n. 5, p. 920-943, maio 2022. DOI: 10.1016/j.joms.2022.02.008.

SHIBLI, J. Á. *et al.* Metabolic activity of hydro-carbon-oxo-borate on a multispecies subgingival periodontal biofilm: a short communication. **Clin. Oral Investig.**, v. 25, n. 10, p. 5945-5953, out. 2021. DOI: 10.1007/s00784-021-03900-0.

SILVA, P. G. B. *et al.* Photodynamic therapy and photobiomodulation therapy in zoledronic acid-induced osteonecrosis in rats. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 38, p. 102889, jun. 2022. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2022.102889.

SILVA, P. G. *et al.* Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Arch. Oral Biol.**, v. 60, n. 9, p.1237-1245, jun. 2015. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.015.

SOARES, A. P. *et al.* Bisphosphonates: pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 42, p. 212-217, jan. 2016. DOI: 10.1016/j.etap.2016.01.015.

SOMA, T. *et al.* Tooth extraction in mice administered zoledronate increases inflammatory cytokine levels and promotes osteonecrosis of the jaw. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 39, n. 3, p. 372-384, nov. 2021. DOI: 10.1007/s00774-020-01174-2.

STATKIEVICZ, C. *et al.* Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 184, p. 7-17, jul. 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004.

TARTAROTI, N. C. *et al.* Antimicrobial photodynamic and photobiomodulation adjuvant therapies for prevention and treatment of medication-related osteonecrosis of the jaws: case series and long-term follow-up. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 29, p. 101651, mar. 2020. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101651.

TORO, L. F. *et al.* Application of autologous platelet-rich plasma on tooth extraction site prevents occurrence of medication-related osteonecrosis of the jaws in rats. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 22, jan. 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37063-y.

WAINWRIGHT, M. Photoantimicrobials and PACT: what's in an abbreviation? **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 18, n. 1, p. 12-14, out. 2019. DOI: 10.1039/c8pp00390d.

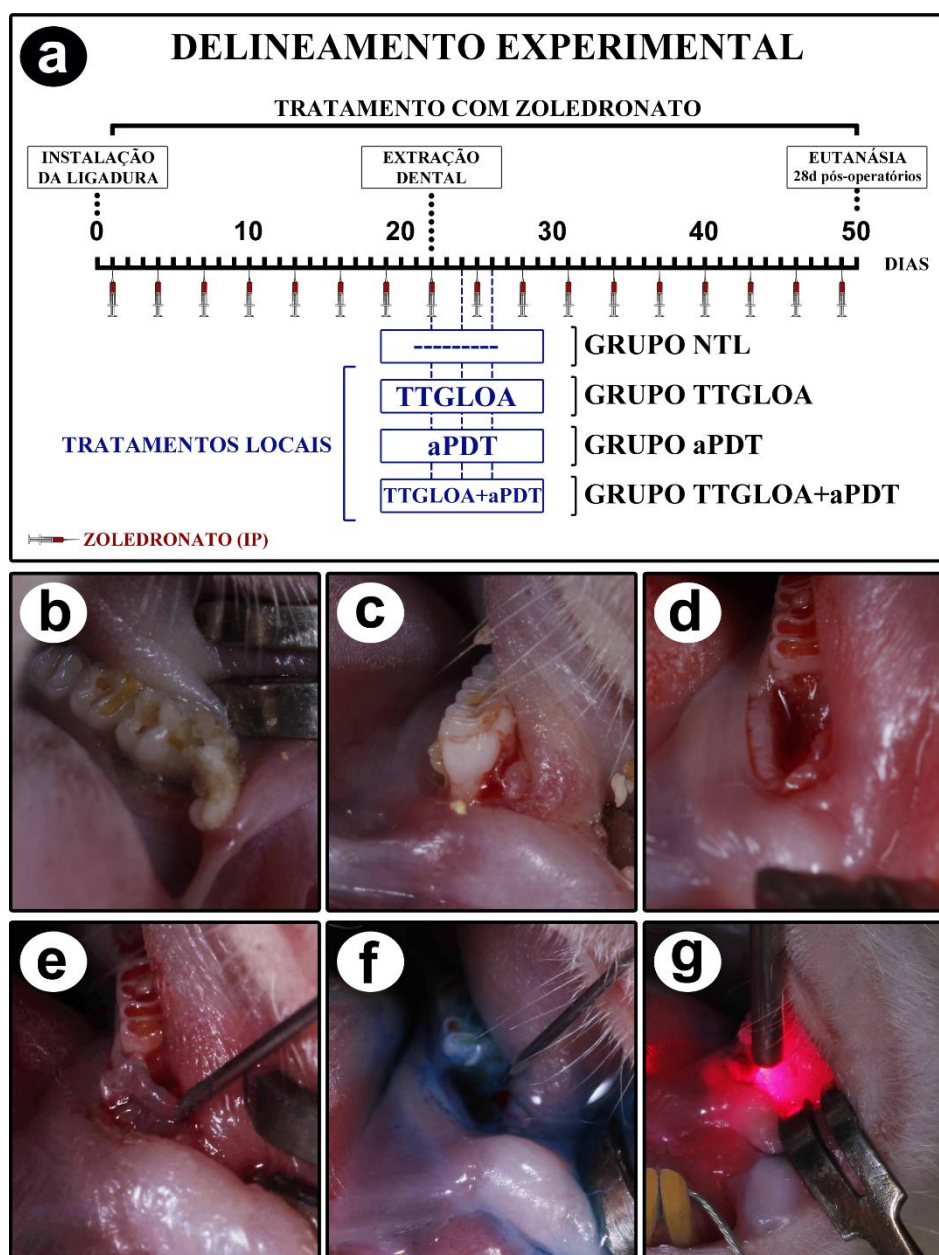
WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, n. 1, p. 13-28, jul. 1998. DOI: 10.1093/jac/42.1.13.

ZHANG, W. *et al.* The role of the immune response in the development of medication-related osteonecrosis of the jaw. **Front. Immunol.**, v. 12, p. 606043, fev. 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.606043.

ZHU, W. *et al.* Zoledronic acid promotes TLR-4-mediated M1 macrophage polarization in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **FASEB J.**, v. 33, n. 4, p. 5208-5219, abr. 2019. DOI: 10.1096/fj.201801791RR.

FIGURAS

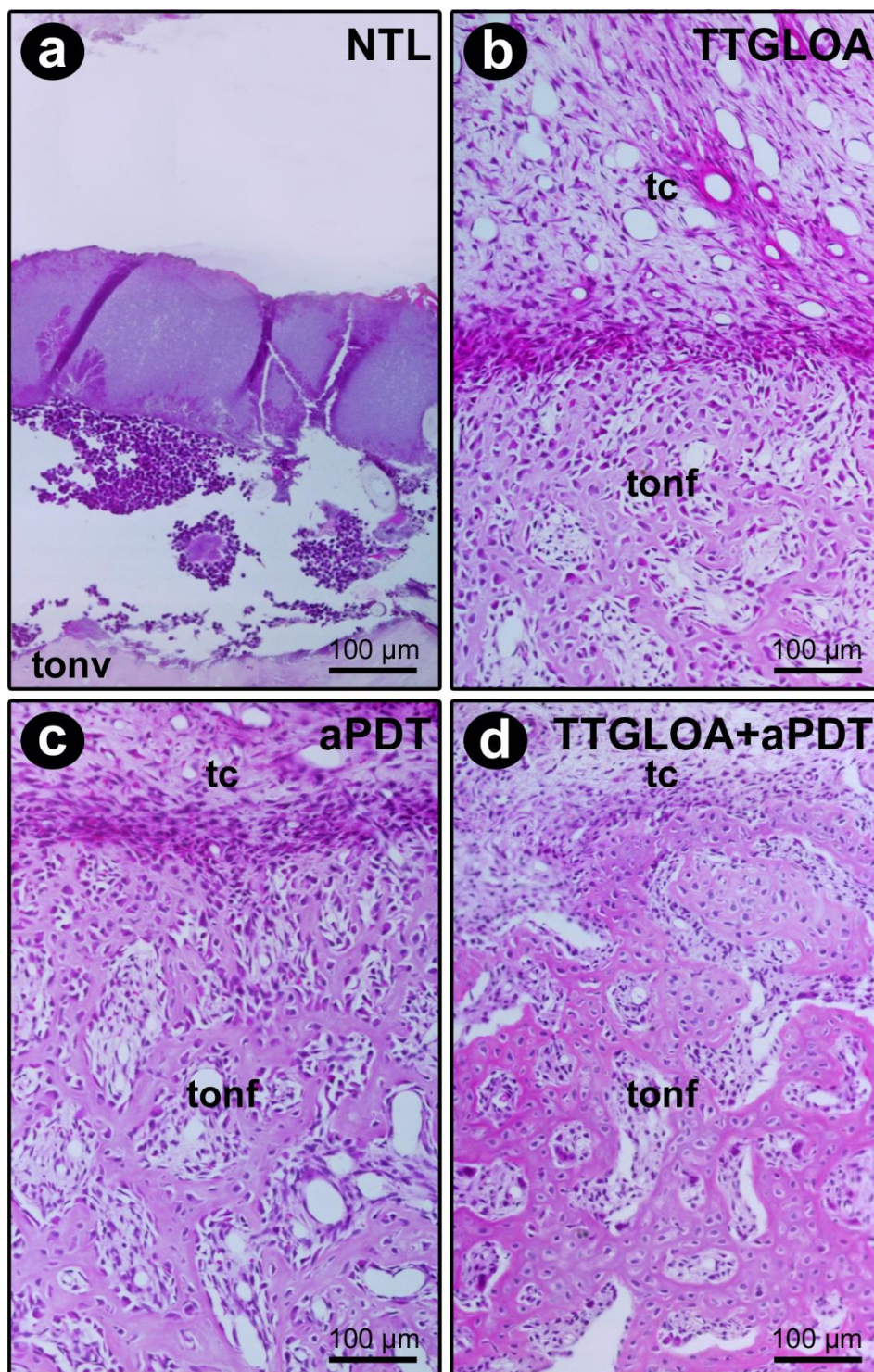
Figura 1 - Delineamento experimental e principais procedimentos operatórios



Legenda: (a) Linha do tempo mostrando os diferentes procedimentos experimentais executados em seus respectivos momento nos grupos NTL, aPDT, TTGLOA e TTGLOA+aPDT. (b) Aspecto clínico do primeiro molar inferior três semanas após a manutenção da ligadura. (c) Aspecto clínico do primeiro molar inferior após a remoção da ligadura. (d) Aspecto clínico do sítio de extração dental imediatamente após a exodontia. (e) O gel liberador de oxigênio ativo (blue@m) sendo depositado no sítio de extração dental. (f) Deposição do fotoantimicrobiano, azul de metileno, no sítio de extração dental. (g) Execução da aPDT no sítio de extração dental com sua a irradiação com laser de baixa potência após a tempo de pré-irradiação do fotoantimicrobiano sobre a área. Abreviações: aPDT, terapia fotodinâmica antimicrobiana; IP, via de administração intraperitoneal; TTGLOA, terapia tópica com gel liberador de oxigênio ativo.

Fonte: Autor, 2023.

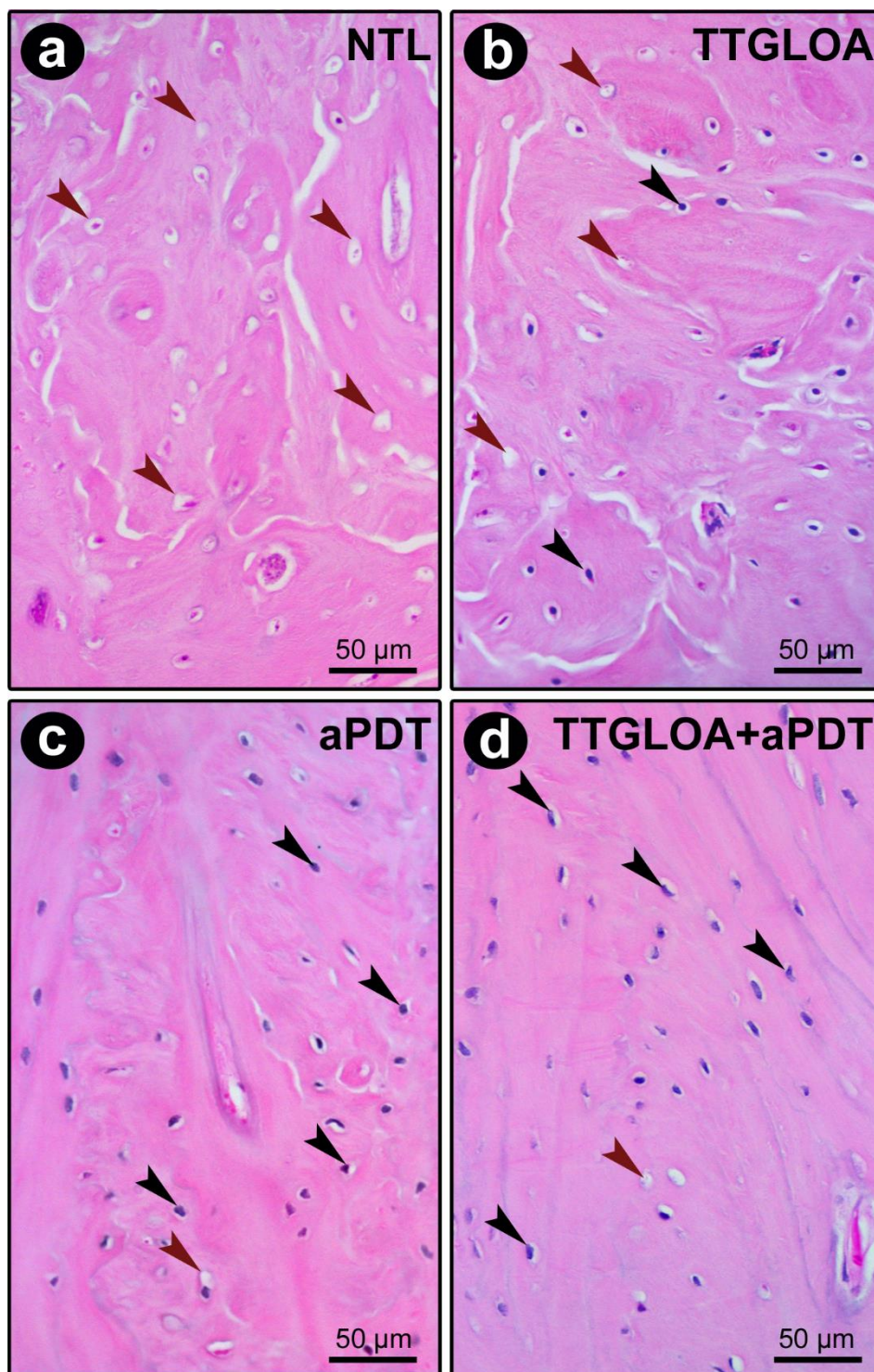
Figura 2 - Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatório



Legenda: (a - d) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico de tecido ósseo neoformado (TONF) no sítio de extração dental aos 28 dias pós operatório em NTL (a), TTGLOA (b), aPDT (c), TTGLOA+aPDT (d). Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; tonf, tecido ósseo neoformado. Coloração: HE. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100µm

Fonte: Autor, 2023.

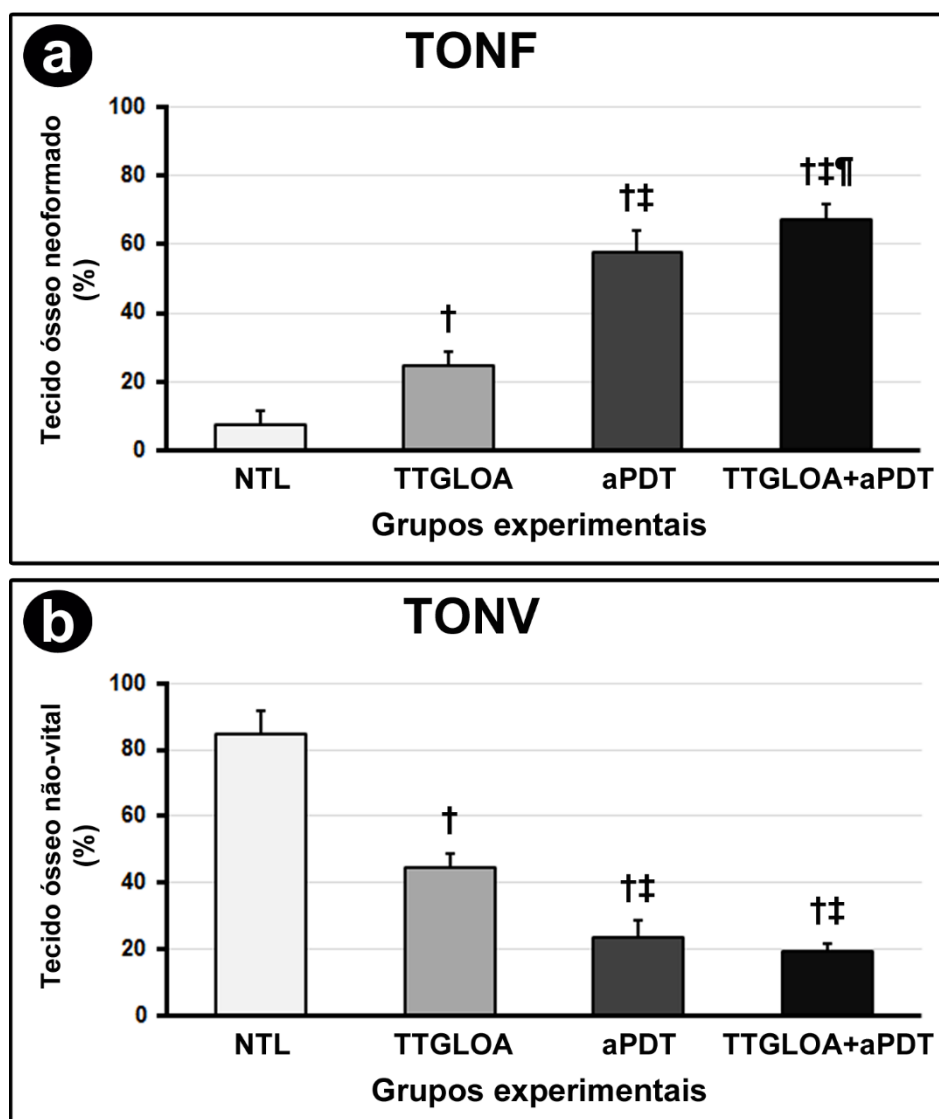
Figura 3 - Aspecto histológico do tecido ósseo adjacente ao sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatório



Legenda: (a - d) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico de tecido ósseo em NTL (a), TTGLOA (b), aPDT (c), TTGLOA+aPDT (d). Abreviações e símbolos: setas pretas, lacunas contendo osteócitos; setas vermelhas, lacunas vazias de osteócitos ou remanescentes de osteócitos. Coloração: HE. Aumento original: 100x. Barras de escala: 50μm.

Fonte: Autor, 2023.

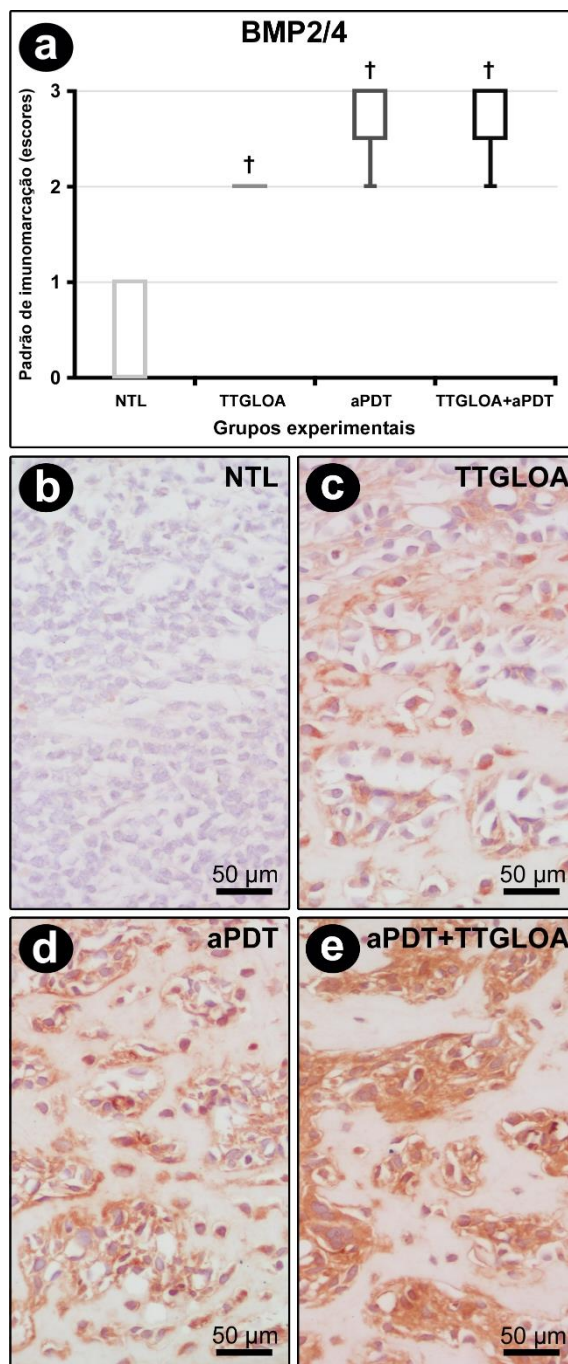
Figura 4 - TONF e TONV



Legenda: (a – b) Gráfico mostrando a porcentagem de tecido ósseo neoformado (TONF) (a) e a porcentagem de tecido ósseo não vital (TONV) (b) no sítio de extração dental e adjacências nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TTGLOA; § diferença estatisticamente significativa com grupo aPDT.

Fonte: Autor, 2023.

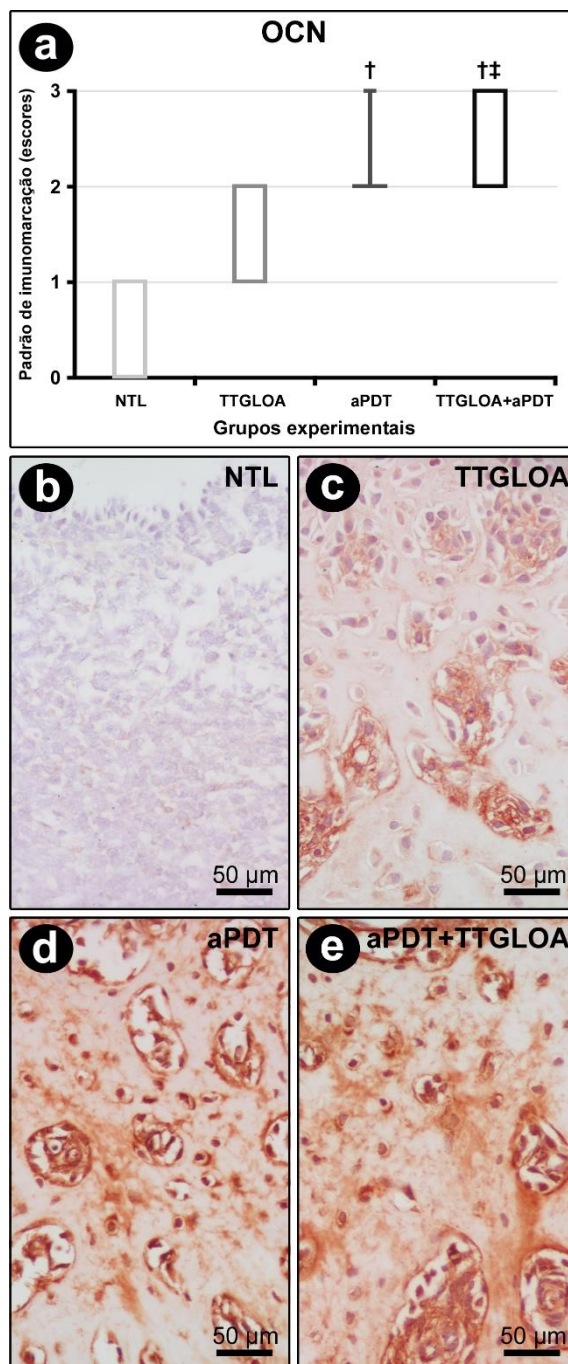
Figura 5 – Padrão de imunomarcacão para BMP2/4 no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatório



Legenda: (a) Gráfico mostrando a mediana e o desvio interquartis dos escores atribuídos a imunomarcacão para BMP2/4. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NTL. (b - e) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da imunomarcacão para BMP2/4 no sítio de extração dental em NTL (b), TTGLOA (c), aPDT (d), TTGLOA+aPDT (e). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50µm.

Fonte: Autor, 2023.

Figura 6 – Padrão de imunomarcção para OCN no sítio de extração dental aos 28 dias pós-operatório



Legenda: (a) Gráfico mostrando a mediana e o desvio interquartil dos escores atribuídos a imunomarcção para OCN. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TTGLOA. (b - e) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da imunomarcção para OCN no sítio de extração dental em NTL (b), TTGLOA (c), aPDT (d), TTGLOA+aPDT (e). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50µm.

Fonte: Autor, 2023.

TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do nível de inflamação dos tecidos durante o processo de reparação pós-extração dental em NTL, TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT aos 28 dias pós-operatórios

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: NÍVEL DE INFLAMAÇÃO				
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES			
	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	NTL	TTGLOA	aPDT	TTGLOA+aPDT
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL				
(1) ausência de inflamação	-	-	71,4	85,7
(2) pequena quantidade de células inflamatórias (menos de 1/3 das células presentes são células inflamatórias)	-	71,4	28,6	14,3
(3) moderada quantidade de células inflamatórias (entre 1/3 e 2/3 das células presentes são células inflamatórias)	28,6	28,6	-	-
(4) grande quantidade de células inflamatórias (mais de 2/3 das células presentes são células inflamatórias)	71,4	-	-	-
MEDIANA	4	2	1^{†‡}	1^{†‡}
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO				
(1) ausência de inflamação	-	-	71,4	85,7
(2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo	-	71,4	28,6	14,3
(3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo, sem atingir o tecido ósseo	14,3	28,6	-	-
(4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo	85,7	-	-	-
MEDIANA	4	2	1[†]	1^{†‡}

Legenda: Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TTGLOA.

Fonte: Autor, 2023.

Tabela 2 - Parâmetros, escores e distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica do padrão de estruturação tecidual durante o processo de reparação pós-extração dental em NTL, TTGLOA, aPDT e TTGLOA+aPDT aos 28 dias pós-operatórios

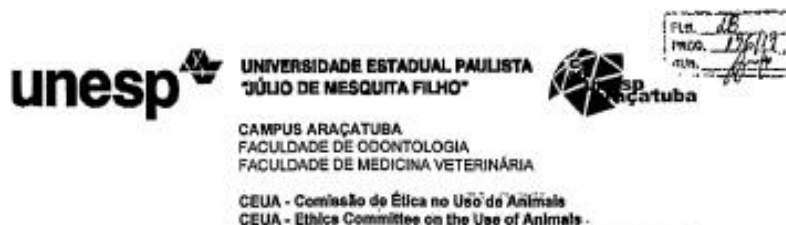
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA: PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO TECIDUAL				
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES			
	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	NTL	TTGLOA	aPDT	TTGLOA+aPDT
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL				
(1) tecido epitelial de moderada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração	-	-	57,1	85,6
(2) tecido epitelial de delgada espessura recobrimdo completamente o sítio de extração	-	57,1	42,9	14,3
(3) delgada camada de tecido epitelial apenas nas margens da ferida cirúrgica aberta	14,3	42,9	-	-
(4) ausência de tecido epitelial sobre a ferida cirúrgica aberta	85,6	-	-	-
MEDIANA	4	2	1[†]	1^{†‡}
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO				
(1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas	-	-	28,6	57,1
(2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	57,1	71,4	42,9
(3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	28,6	42,9	-	-
(4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose tecidual	71,4	-	-	-
MEDIANA	4	2	2[†]	1^{†‡}
PADRÃO DE CELULARIDADE E DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO				
(1) ausência de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo mais da metade do alvéolo dental	-	-	-	-
(2) ausência ou presença de poucas áreas de osso de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo mais da metade do alvéolo dental	-	28,6	100	100
(3) presença de poucas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo e trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental	-	71,4	-	-
(4) presença de muitas áreas de osso não vital nas adjacências do alvéolo com ausência de neoformação óssea ou trabéculas ósseas preenchendo menos de um terço do alvéolo dental	100	-	-	-
MEDIANA	4	3[†]	2^{†‡}	2^{†‡}

Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NTL; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TTGLOA.

Fonte: Autor, 2023.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FOA/UNESP)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana e do Blue-M no reparo alveolar em ratas tratadas com dose oncológica de zoledronato", Processo FOA nº 00196-2019, sob responsabilidade de Letícia Helena Theodoro apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 10 de Abril de 2019.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 01 de Maio de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Junho de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of antimicrobial photodynamic therapy and Blue-M on alveolar repair in rats treated with zoledronate oncological dose", Protocol FOA nº 00196-2019, under the supervision of Letícia Helena Theodoro presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 10, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 01, 2021

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 01, 2021

Prof. Ass. Dr. Leonardo Pérez Faverani
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16016-050 - ARAÇATUBA - SP
 Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foc.unesp.br

ANEXO B – Normas para publicação no periódico *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*

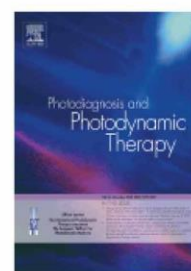


PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.1
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.3



ISSN: 1572-1000

DESCRIPTION

Official Journal of the [European Platform for Photodynamic Medicine](#)

Affiliated with the [International Photodynamic Association](#)

Also affiliated with the [British Medical Laser Association](#) and the Polish Society for Photodynamic Medicine

INDEXED in MEDLINE/PubMed, SciSearch/Science Citation Index Expanded, Current Contents/Clinical Medicine.

Aims and Scope:

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of **Photodiagnosis** and **Photodynamic Therapy** in all medical specialties. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer-review process.

AUDIENCE

Professionals in all medical disciplines with an interest in medical and biological applications of lasers and light sources, and photodiagnosis/photodynamic therapy in the treatment of human disease.

IMPACT FACTOR

2021: 3.577 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents - Clinical Medicine
Journal Citation Reports - Science Edition
Science Citation Index Expanded
Scopus
ScienceDirect
PubMed/Medline
PubMed/Medline

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Ron Allison, 21st Century Oncology Greenville, Greenville, North Carolina, United States of America

Emeritus Editor

Keyvan Moghissi, Yorkshire Laser Centre, Goole, United Kingdom

Editorial Advisory Board

Adamek, Katowice, Poland

Andrey Akopov, St. Petersburg, Russian Federation

Thoracic surgery, Thoracic oncology

Donald Allan, Manchester, United Kingdom

Ernest Allan, Knutsford, United Kingdom

Barber, Dundee, United Kingdom

Barr, Gloucester, United Kingdom

Alcira Battle, Buenos Aires, Argentina

Berg, Oslo, Norway

Boyle, Hull, United Kingdom

Kate Dixon, Goole, United Kingdom

Downie, Mount Pleasant, Texas, United States of America

Eljamel, Lanark, United Kingdom

Reza Fekrazad, Tehran, Iran

Freitag, Hemer, Germany

Furukawa, Inashiki-gun, Japan

Gasparyan, Helsinki, Finland

Gilles Gasser, Zurich, Switzerland

Michael Hamblin, Boston, Massachusetts, United States of America

Photodynamic therapy, photobiomodulation, low level laser therapy, photosensitizes, photochemical mechanisms, Anti-tumor/tumour immune response, cancer, Wound healing and infectious disease, Atherosclerotic vulnerable plaque

Hillemanns, Hannover, Germany

Hopper, Bromley, United Kingdom

Horvath, Brno, Czechia

Sally Ibbotson, Dundee, United Kingdom

PDT in clinical dermatology

Jichlinski, Lausanne, Switzerland

Asta Juzeniene, Oslo, Norway

Chronic Lymphocytic Leukemia CLL, tumor microenvironment, exosomes, extracellular vesicles, anti-tumor immunity, hematological malignancies

Nasim Kashef, Tehran, Iran

Kato, Tokyo, Japan

Herwig Kostron, Innsbruck, Austria

Lecleire, Rouen, France

Leroy, Suresnes, France

Li, Guangzhou, Guangdong, China

Makela, Helsinki, Finland

Thomas S. Mang, Orchard Park, New York, United States of America

Moseley, Dundee, United Kingdom

Nakamura, Shimotsuga-gun, Japan

Dominic Robinson, Rotterdam, Netherlands

Patrick Ross, Columbus, Ohio, United States of America

Sieron, Bytom, Poland

Stummer, Münster, Germany

Tan, Amsterdam, Netherlands

Thorpe, Leeds, United Kingdom

Turnbull, Hull, United Kingdom

Waidelich, München, Germany

Mark Wainwright, Liverpool, United Kingdom

Dyes in medicine, photoantimicrobials, photodynamic therapy, medicinal chemistry

Walt, Zurich, Switzerland

Xiuli Wang, Shanghai, China

Wolfson, Jacksonville, Florida, United States of America

Woong-Shick, Seocho-gu, South Korea

Piotr Ziolkowski, Wrocław, Poland

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Scope

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy is an international journal for the dissemination of scientific knowledge and clinical developments of Photodiagnosis and Photodynamic Therapy in all medical specialities. The journal publishes original articles, review articles, case presentations, "how-to-do-it" articles, Letters to the Editor, short communications and relevant images with short descriptions. All submitted material is subject to a strict peer review process.

Types of manuscript

Research Papers should report original clinical studies or research not previously published or being considered for publication elsewhere. Work in Progress may also be submitted. See below for the standard layout. Submission of a manuscript to this journal gives the publisher the right to publish that paper if it is accepted. Manuscripts may be edited to improve clarity and expression.

Review articles, including institutional reviews of recent developments are welcome, and will undergo peer review. Reviews should have an abstract of up to 250 words.

Editorials

Although most Editorials in the journal are commissioned, authors may contact the Editor-in-Chief to request submission of their own Editorial.

Correspondence. Readers are encouraged to write about any topic that relates to photodiagnosis or photodynamic therapy, clinical, scientific, educational, social or economic. Letters should be no longer than 500 words and may include discussions on material previously printed in the Journal.

Case report will be considered if formatted as a research letter with 2 figures maximum. Maximum length is up to 1000 words with no headings and up to 6 references and 2 tables or figures. An abstract of 150-200 words should also be provided.

Short Communications should not exceed 1000 words and should consist of a background section (not to exceed 100 words), aims (not to exceed 50 words), methods (not to exceed 250 words), results (not to exceed 250 words) and conclusion (not to exceed 250 words). An abstract of 150-200 words should also be provided. The editorial team reserves the right to decide which tables/figures submitted are necessary.

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 interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

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 encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [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.

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 [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author 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.

Referees

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees who are willing to review the article (please obtain confirmation from the referees before submitting your manuscript). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Revised version of the manuscript

On the basis of the comments of the referees and editors, Authors may be asked to revise their manuscript. In order to facilitate the evaluation of the revisions by the referees and editors, upon revision, Authors are asked:

- to indicate all changes to the original manuscript by means of 'track changes'
- to add a letter for the referees, explaining how they dealt with all of the recommendations and questions from the referees. Authors should submit their revised version no later than 9 months after they were informed about the decision that the manuscript needs revision. If no revised manuscript is received 9 months after the decision, the manuscript will be considered as rejected.

PREPARATION

Style

Please use **no abbreviations**. Headlines and Subheadlines should be liberally employed in the Methods, Results, and Discussion sections. Use short paragraphs whenever possible. Clarity of expression, good syntax and the avoidance of medical jargon will be appreciated by the editors, reviewers and readers.

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](#).

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.

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 one independent expert reviewer 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](#).

Open access

This journal offers authors two choices to publish their research;

1. Open Access

- o Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- o An open access publication fee is payable by authors or their research funder

2. Subscription

- o Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [access programs](#)
- o No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC-BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. <https://www.elsevier.com/fundingbodies>

If you need to comply with your funding body policy you can apply for the CC-BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$USD 2,500** excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>

Layout of manuscript

Divide the manuscript into the following sections: Title page, Structured Abstract, Key words (3-6), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References. The editors will consider the use of other sections if more suitable for certain manuscripts.

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.

The **Structured Abstract**, of no more than 250 words, should be written with particular care since this will be the only part of the article studied by some readers. The preferred subheadings are: Background, Methods, Results and Conclusions.

The **Introduction** should be brief and set out the purposes for which the study has been performed along with relevant previous studies only where essential.

The **Materials and Methods** should be sufficiently detailed so that readers and reviewers can understand precisely what has been done without studying the references directly. The description may be abbreviated when well accepted techniques are used.

The **Results** should be presented precisely. Keep discussion of their importance to a minimum in this section of the manuscript.

The **Discussion** should directly relate to the study being reported. Do not include a general review of the topic.

Tables should be typed with double spacing and each should be on a separate sheet. They should be numbered consecutively with Arabic numerals, and contain only horizontal lines. Provide a short descriptive heading above each table with footnotes and/or explanations underneath.

Figures should ideally be submitted in high-resolution TIF format, or alternatively in GIF, JPEG/JPG, or EPS format. The figures should be placed in separate files, named purely with the figure numbers (e.g. "Figure1.tif".) The cost of colour figures will be paid by the author.

Legends for Figures should be typed with double-spacing on a separate sheet.

Gene Accession Numbers

For each and every gene accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. Example: (GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Supplementary data

The journal accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>

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 examples here: [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).

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.

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.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

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

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, 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 all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- 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.](#)

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.

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] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

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.

Research data

This journal encourages 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. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your 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. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged 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).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

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](#).

Process of submission

Online submission

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy uses an online submission and review system. Authors can upload their article via the Elsevier Editorial System at <https://www.editorialmanager.com/PDPDT>. By accessing the website Authors will be guided stepwise through the uploading of the various files. Editable file formats are necessary. We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Figure files (TIFF, EPS, JPEG) should be uploaded separately. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used. The system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary. For assistance please visit our [Support Center](#).

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. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). 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](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>