

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS**

LARISSA TRARBACH FIGUEIREDO BRAGA

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE AS
CÉLULAS DA GENGIVA DE CAMUNDONGOS COM PERIODONTITE
EXPERIMENTAL**

**VITÓRIA - ES
2024**

LARISSA TRARBACH FIGUEIREDO BRAGA

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE AS CÉLULAS
DA GENGIVA DE CAMUNDONGOS COM PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como pré-requisito para o título de mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvana dos Santos Meyrelles.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Marcella Leite Porto.

VITÓRIA – ES
2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B813e Braga, Larissa Trarbach Figueiredo, 1986-
Efeitos da terapia a laser de baixa intensidade sobre as células da gengiva de camundongos com periodontite experimental / Larissa Trarbach Figueiredo Braga. - 2024. 63 f. : il.

Orientadora: Silvana dos Santos Meyrelles.

Coorientadora: Marcella Leite Porto.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Lasers em odontologia. 2. Periodontite. 3. Estresse oxidativo. I. Meyrelles, Silvana dos Santos. II. Porto, Marcella Leite. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 616.314

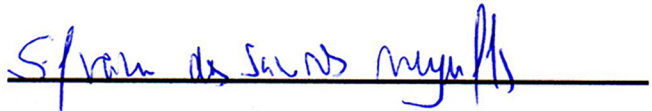
LARISSA TRARBACH FIGUEIREDO BRAGA

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE AS CÉLULAS DA
GENGIVA DE CAMUNDONGOS COM PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas na área de concentração Etiopatogênese das doenças da boca

Aprovada em 15 de julho 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA



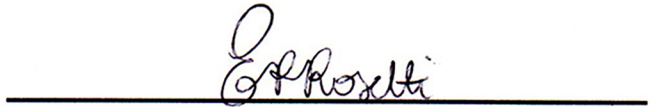
Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Marcella Leite Porto
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Espírito Santo
Coorientadora



Prof^a. Dr^a. Bianca Prandl Campagnaro
Universidade Vila Velha



Prof^a. Dr^a. Elizabeth Pimentel Rosetti
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Minha eterna e diária gratidão a Deus por me conceder saúde, força e sabedoria para enfrentar os desafios ao longo dessa jornada.

Ao meu amor, Hevan, pela paciência, companheirismo, abdicção e amor demonstrados ao longo deste tempo. À minha família, especialmente aos meus pais, Francisco (in memoriam) e Ruth, pelos valores morais e éticos, pelo amor incondicional, apoio e incentivo constantes. Às minhas amadas irmãs, Ana Cecília e Fabíola, pelo incentivo, cuidado, carinho e suporte emocional. Vocês, que por muitas vezes renunciaram a sonhos para que os meus pudessem ser realizados, muito obrigada! Sem vocês, chegar até aqui não teria sido possível.

Agradeço à minha orientadora, Silvana, e à minha coorientadora, Marcella, por toda a orientação, paciência e conhecimento compartilhado durante o desenvolvimento deste trabalho. Suas contribuições foram fundamentais para a realização deste estudo.

Aos meus colegas e amigos de laboratório e de mestrado, pelos momentos de cooperação, troca de ideias e apoio nos momentos difíceis. A convivência e parceria de vocês foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos e familiares, pela amizade, pelos momentos de descontração, pelas palavras de incentivo nos momentos de desânimo e pela alegria compartilhada com mais esta conquista.

Aos meus pacientes, pela compreensão durante este período de estudo.

Finalmente, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Cada palavra de apoio, cada gesto de incentivo e cada ensinamento recebido foram essenciais para a conclusão deste projeto.

RESUMO

Introdução: A periodontite é uma doença inflamatória crônica multifatorial, associada a microrganismos disbióticos que, por meio da presença de biofilme bacteriano, modificam o ambiente homeostático do periodonto e acarretam prejuízos à saúde sistêmica. As alterações inflamatórias dificultam a resposta imune do hospedeiro e causam a degradação dos tecidos de proteção e suporte dos dentes, que, por consequência, podem levar à perda dentária. A terapia a laser de baixa intensidade (LLLT, do inglês Low-Level Laser Therapy) vem sendo estudada por diminuir a inflamação e atuar em processos celulares, com resultados positivos. Entretanto, ainda permanece discutível a sua utilização associada a tratamentos periodontais. **Objetivos:** Avaliar o efeito da LLLT sobre espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês Reactive oxygen species) e apoptose no tecido gengival e, em parâmetros sistêmicos relacionados à inflamação e ao estresse oxidativo causados pela periodontite experimental. **Métodos:** Esta pesquisa experimental foi realizada em camundongos da linhagem C57/BL6, com 16 semanas de idade, divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle (C) - sem intervenção; controle+LLLT (C+L) - sem intervenção e tratados com LLLT; periodontite (P) - com periodontite induzida por ligadura; periodontite+LLLT (P+L) - com periodontite induzida por ligadura e tratados com LLLT. Após 28 dias de indução, a ligadura foi removida e os animais tratados com raspagem e alisamento radicular (RAR), e a aplicação de LLLT foi realizada por 3 dias (4 joules por sessão). Ao fim do tratamento, os animais foram eutanasiados; a gengiva, a mandíbula e o plasma foram separados para análise. Na mandíbula, para confirmar a periodontite, mensuramos a perda óssea alveolar por microscopia eletrônica de varredura (MEV). No tecido gengival foram avaliados os níveis de ROS e a apoptose das células por citometria de fluxo. No plasma, foi realizada a análise da atividade inflamatória através da enzima mieloperoxidase (MPO), a oxidação proteica, por meio do ensaio dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), ambos por espectrofotometria; para os níveis de citocinas, citometria de fluxo foi utilizada. **Resultados:** A periodontite foi confirmada. A LLLT reduziu os níveis de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio no tecido gengival em aproximadamente 18% e 26%, respectivamente. A apoptose nas células gengivais foi 32% menor nos animais tratados com LLLT na periodontite. A atividade inflamatória sistêmica e a oxidação proteica diminuíram em 49,3% e 38,6%, respectivamente. No grupo P+L, os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12p70 foram reduzidos, enquanto a citocina anti-inflamatória IL-10 aumentou em comparação com o grupo P ($p < 0,05$). **Conclusão:** Neste modelo experimental, a utilização da LLLT regulou efetivamente os níveis de ROS e apoptose no tecido gengival, influenciando marcadores plasmáticos de estresse oxidativo e inflamação.

Palavras-chaves: periodontite; estresse oxidativo; camundongos; terapia a laser de baixa intensidade; LLLT.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is a multifactorial chronic inflammatory disease associated with dysbiotic microorganisms that, through the presence of bacterial biofilm, alter the homeostatic environment of the periodontium and impair systemic health. The inflammatory changes hinder the host's immune response and cause degradation of the protective and supportive tissues of the teeth, which can consequently lead to tooth loss. Low-Level Laser Therapy (LLLT) has been studied for its potential to reduce inflammation and influence cellular processes with positive results. However, its use in conjunction with periodontal treatments remains debatable. **Objectives:** To evaluate the effect of LLLT on reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in gingival tissue, and on systemic parameters related to inflammation and oxidative stress caused by experimental periodontitis. **Methods:** This experimental research was conducted on 16-week-old C57/BL6 mice, randomly divided into four groups: control (C) - no intervention; control+LLLT (C+L) - no intervention and treated with LLLT; periodontitis (P) - with ligature-induced periodontitis; periodontitis+LLLT (P+L) - with ligature-induced periodontitis and treated with LLLT. After 28 days of induction, the ligature was removed and the animals were treated with scaling and root planing (SRP), and LLLT was applied for 3 days (4 joules per session). At the end of the treatment, the animals were euthanized; the gingiva, mandible, and plasma were separated for analysis. In the mandible, to confirm periodontitis, we measured alveolar bone loss using scanning electron microscopy (SEM). In gingival tissue, ROS levels and cell apoptosis were evaluated by flow cytometry. In plasma, inflammatory activity was analyzed through the enzyme myeloperoxidase (MPO), and protein oxidation was assessed using the advanced oxidation protein products (AOPP) assay, both by spectrophotometry; cytokine levels were measured using flow cytometry. **Results:** Periodontitis was confirmed. LLLT reduced superoxide anion and hydrogen peroxide levels in gingival tissue by approximately 18% and 26%, respectively. Apoptosis in gingival cells was 32% lower in LLLT-treated animals with periodontitis. Systemic inflammatory activity and protein oxidation decreased by 49.3% and 38.6%, respectively. In the P+L group, plasma levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-12p70 were reduced, while the anti-inflammatory cytokine IL-10 increased compared to the P group ($p < 0.05$). **Conclusion:** In this experimental model, the use of LLLT effectively regulated ROS levels and apoptosis in gingival tissue, influencing plasma markers of oxidative stress and inflammation.

Keywords: periodontitis; oxidative stress; mice; low-level laser therapy; LLLT.

LISTA DE ABREVIATURAS

μm : Micrometros

μM : Millimolar

AOPP: Advanced oxidation protein products- produtos avançados de oxidação proteica

AsGaAl: Arseneto de Gálio e Alumínio

ATP: Adenosina tri-fosfato

CBA: Cytometric Bead Array

DCF-DA: Diacetato diclorofluoresceína

DHE: Dihidroetídeo

EPM: Erro padrão da média

JCE: Junção cimento-esmalte

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

J: Joules

LLLT: Low-level laser therapy- Terapia a laser de baixa intensidade

MFI: Mean fluorescence intensity- Mediana da intensidade de fluorescência emitida

MPO: Mieloperoxidase

MEV: Microscópio eletrônico de varredura

nm: Nanômetros

$\cdot\text{O}_2^-$: Ânion superóxido

PBS: Phosphate buffered saline- Solução tampão fosfato-salina

RAR: Raspagem e alisamento radicular

ROA: Rebordo ósseo alveolar

ROS: Reactive oxygen species- Espécies reativas de oxigênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Confirmação do modelo de periodontite experimental.....	21
Figura 2. Níveis de DHE e DCF nos grupos experimentais.	22
Figura 3. Taxa de apoptose nos grupos experimentais.....	23
Figura 4. Níveis da atividade plasmática da MPO e AOPP.....	23
Figura 5. Desenho esquemático da metodologia.	36
Figura 6. Diagrama dos resultados e possíveis mecanismos da LLLT.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de citocinas plasmáticas.....	24
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	RESULTADOS	14
3.1	ARTIGO: Efeitos moduladores da Terapia com Laser de Baixa Intensidade (LLLT) nas respostas oxidativas e inflamatórias em um modelo animal de periodontite.....	14
	Resumo	16
	3.1.1 Introdução	16
	3.1.2 Materiais e métodos	17
	3.1.2.1 Animais	17
	3.1.2.2 Modelo de periodontite experimental e protocolo LLLT	17
	3.1.2.3 Coleta e processamento das amostras	18
	3.1.2.4 Confirmação da periodontite experimental	18
	3.1.2.5 Níveis intracelulares de ROS	18
	3.1.2.6 Apoptose de células gengivais	19
	3.1.2.7 Avaliação da atividade inflamatória sistêmica e estresse oxidativo	19
	3.1.2.8 Quantificação de citocinas no plasma	19
	3.1.3 Análise estatística	20
	3.1.4 Resultados	20
	3.1.4.1 Confirmação do modelo de periodontite experimental	20
	3.1.4.2 LLLT reduz a produção de ROS e apoptose em células gengivais	22
	3.1.4.3 Potenciais efeitos sistêmicos anti-inflamatórios e antioxidantes da LLLT	23
	3.1.5 Discussão	24
	3.1.7 Conclusão	26
	Referências	27
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32

REFERÊNCIAS GERAIS.....	34
APÊNDICE A- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
APÊNDICE B- RESULTADOS E POSSÍVEIS MECANISMOS DE ATUAÇÃO DA LLLTT	37
ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA-UFES).....	38
ANEXO B- NORMAS DA REVISTA LASERS IN MEDICAL SCIENCE	39

1 INTRODUÇÃO GERAL

A periodontite é uma doença inflamatória crônica de alta prevalência, causada principalmente pela presença de um biofilme dental disbiótico que afeta as estruturas de suporte dentário, o ligamento periodontal e o osso alveolar (PAPAPANOU *et al.*, 2018). A perda da homeostase, desencadeada pela interação entre bactérias disbióticas e fatores imunológicos do indivíduo, bem como influências ambientais, hormonais, doenças crônicas e doenças do envelhecimento, pode ser associada à progressão e severidade da periodontite (GREBU *et al.*, 2020; WHO, 2022).

No Brasil, os resultados mais recentes do Projeto Pesquisa e Saúde Bucal (SB Brasil) referem-se ao ano de 2010, e indicam uma prevalência de 19,4% de periodontite em adultos (BRASIL, 2011). A inflamação crônica, presente na periodontite, aliada à falta de tratamento, pode causar a destruição progressiva dos tecidos periodontais e, eventualmente, levar à perda de dentes. Além disso, traz impactos para a saúde sistêmica, pela liberação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea (HAJISHENGALLIS, 2015).

A periodontite, assim como outras doenças crônicas, está vinculada ao estresse oxidativo, um mecanismo que promove um desequilíbrio entre fatores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios nas células gerando excesso de radicais livres que comprometem a resposta imune do indivíduo (DENG *et al.*, 2024). O estresse oxidativo, através do aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), afeta a função mitocondrial das células e altera seu metabolismo, podendo levar à morte celular (COSTA *et al.*, 2019).

Ao aplicar novas abordagens de tratamento na patogênese periodontal em estudos clínicos, pode ser necessário o uso prévio de modelos animais, que, pela semelhança genética e bioquímica aos humanos, permitem investigar aspectos como o efeito dos tratamentos nas células, citocinas inflamatórias e a etiologia bacteriana da periodontite (GRAVES *et al.* 2012; VERÍSSIMO *et al.* 2022). O uso de camundongos é interessante pela semelhança anatômica na região do primeiro molar aos humanos. Os modelos experimentais de periodontite por ligadura são relevantes porque causam destruição óssea rápida e severa, semelhante a periodontite humana. A ligadura facilita a adesão do biofilme bacteriano e o desenvolvimento da disbiose periodontal, promovendo danos aos tecidos adjacentes

(MARCHESAN *et al.*, 2018). A análise do tecido gengival, permite identificar as ocorrências associadas ao avanço das doenças periodontais, verificar os mecanismos envolvidos na destruição do tecido, e obter informações cruciais sobre a evolução e as características da doença (BARTOLD; WALSH; NARAYANAN, 2000).

O controle eficaz e o acompanhamento contínuo da periodontite, são cruciais para prevenir sua recorrência (CHAPPLE *et al.*, 2018). Os tratamentos periodontais clássicos, como a raspagem e alisamento radicular, visam prevenir a progressão da periodontite (QADRI *et al.*, 2015; VAN DYKE, 2020). Em busca de terapias cada vez mais direcionadas ao controle da doença, a terapia a laser de baixa intensidade (LLLT, do inglês Low-level Laser Therapy) emerge como uma alternativa promissora pelo seu caráter não invasivo, que tem sido investigada como opção vantajosa para diversos tratamentos, incluindo os periodontais (GHOLAMI *et al.*, 2019).

O laser de baixa potência é uma fonte de luz que tem a funcionalidade de alterar as propriedades dos tecidos biológicos por intermédio de processos físicos e químicos, com níveis de energia muito abaixo daqueles que causam danos aos tecidos, sendo capaz de penetrá-los sem causar lesões. O objetivo principal é de promover a preservação tecidual e reduzir a inflamação (HAMBLIN, 2017; DOMPE *et al.*, 2020;). Os efeitos e impactos biológicos do laser de baixa intensidade, em nível celular e molecular, podem incluir a taxa de proliferação celular, a viabilidade celular, e a integridade e reparo do DNA (MUSSTAF; JENKINS; JHA, 2019).

Apesar disso, ainda permanece incerta a aplicabilidade da LLLT em tratamentos periodontais e suas repercussões sistêmicas devido à variabilidade dependente dos parâmetros de radiação, como comprimento de onda, dose e intensidade da luz do laser (THEODORO *et al.*, 2021). Portanto, este estudo visa avaliar o efeito de um protocolo terapêutico de LLLT sobre os níveis de ROS e apoptose no tecido gengival, bem como indicadores sistêmicos de inflamação e estresse oxidativo em um modelo experimental de periodontite. A compreensão desses efeitos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras na abordagem da periodontite.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos locais e sistêmicos do tratamento com a terapia a laser de baixa intensidade sobre o tecido gengival de camundongos com periodontite experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em células gengivais, especificamente:

- Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ânions superóxido e peróxido de hidrogênio);
- Verificar a taxa de apoptose, determinando a extensão do dano celular.

Determinar os índices de atividade inflamatória e de estresse oxidativo no plasma através do:

- Nível de atividade inflamatória através da enzima mieloperoxidase (MPO);
- Nível de dano oxidativo, por meio da análise dos produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP);
- Níveis de citocinas plasmáticas, sendo elas IL-6, IL-12p70, IL-10, IFN- γ , TNF e MCP-1.

3 RESULTADOS

De acordo com regimento do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, e como resultado da pesquisa desenvolvida, essa dissertação será apresenta em formato de artigo, descrito a seguir. Este artigo foi submetido à revista Lasers in Medical Science e está formatado de acordo com as normas exigidas pela publicação.

3.1 ARTIGO¹

Efeitos moduladores da Terapia com Laser de Baixa Intensidade (LLLT) nas respostas oxidativas e inflamatórias em um modelo animal de periodontite

Larissa Trarbach Figueiredo Braga^{a*}, Isadora Martins Ribeiro^b, Maria Eduarda de Souza Barroso^b, Edgar Hell Kampke^b, Lorena Neves^b, Sara Cecília de Andrade^{a,b}, Guilherme Heleodoro Barbosa^{a,b}, Marcella Leite Porto^c, Silvana dos Santos Meyrelles^{a,b}

Larissa Trarbach Figueiredo Braga^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, Vitória, ES 29043-900, Brasil.

Isadora Martins Ribeiro^b

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900.

E-mail: isadoramartins77@gmail.com

Maria Eduarda de Souza Barroso^b

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, Vitória, ES 29043-900, Brasil.

¹ Artigo submetido e elaborado de acordo com as normas técnicas da revista Lasers in Medical Science.

* Larissa Trarbach Figueiredo Braga: autor correspondente.

E-mail: larissa.trarbach@hotmail.com

E-mail: m.eduarda.sb@live.com

Edgar Hell Kampke^b

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, Vitória, ES 29043-900, Brasil.

E-mail: edkampke@hotmail.com

Lorena Nascimento Santos Neves^b

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, Vitória, ES 29043-900, Brasil.

E-mail: losantosneves@gmail.com

Sara Cecília de Andrade^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, Vitória, ES 29043-900, Brasil.

E-mail: sara.andrade@edu.ufes.br

Guilherme Heleodoro Barbosa^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, Vitória, ES 29043-900, Brasil.

E-mail: guilherme.h.barbosa@edu.ufes.br

Marcella Leite Porto^c

^cLaboratório de Cultura Celular

Instituto Federal do Espírito Santo (IFES)

Av. Ministro Salgado Filho 1000, Vila Velha, ES 29106-010, Brasil.

E-mail: marcela.porto@ifes.edu.br

Silvana dos Santos Meyrelles^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, Vitória, ES 29043-900, Brasil.

E-mail: silvana.meyrelles@ufes.br

Resumo

A periodontite é uma doença oral iniciada por um biofilme dental disbiótico. A eficácia da terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) associada ao tratamento periodontal básico ainda não está completamente estabelecida. Este estudo investiga o impacto da LLLT em marcadores locais de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose e, sistêmicos de inflamação e estresse oxidativo em um modelo animal de periodontite experimental. Utilizamos 48 camundongos C57BL/6, divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle (C), controle mais LLLT (C+L), periodontite (P) e periodontite mais LLLT (P+L). A LLLT foi administrada usando um diodo infravermelho (808 nm) com densidade de energia de 133,3 J/cm² (4 J por sessão) por três dias. ROS e apoptose foram avaliados no tecido gengival, enquanto os marcadores inflamatórios da mieloperoxidase (MPO), citocinas e a oxidação proteica foram avaliados no plasma. Os dados foram analisados usando ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey, com significância em $p < 0,05$. A LLLT reduziu os níveis de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio no tecido gengival em aproximadamente 18% e 26%, respectivamente. A apoptose nas células gengivais foi 32% menor nos animais tratados com LLLT na periodontite. A atividade inflamatória sistêmica e a oxidação proteica diminuíram em 49,3% e 38,6%, respectivamente. No grupo P+L, os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12p70 foram reduzidos, enquanto a citocina anti-inflamatória IL-10 aumentou em comparação com o grupo P ($p < 0,05$). Em conclusão, neste modelo animal de periodontite, a LLLT regulou efetivamente a produção de ROS e a apoptose no tecido gengival, influenciando significativamente os marcadores sistêmicos de estresse oxidativo e inflamação.

Palavras-chave: Periodontite; terapia com laser de baixa intensidade; espécies reativas de oxigênio; estresse oxidativo; citometria de fluxo; camundongos.

3.1.1 Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória crônica multifatorial da cavidade oral associada a microrganismos disbióticos presentes no biofilme dentário [1]. Afeta aproximadamente 35% da população adulta [2], e leva à perda irreversível das estruturas de suporte dos dentes e, eventualmente, dos próprios dentes [3]. O tecido gengival serve como o principal local para as alterações celulares envolvidas na patogênese das doenças periodontais. A desregulação da resposta inflamatória local facilita o início e a progressão da periodontite [4].

A evidência de perda óssea alveolar [1], resultante de uma reação inflamatória descontrolada nos tecidos periodontais [3] é o critério para o diagnóstico da periodontite. Além da inflamação e da perda óssea alveolar, a periodontite é caracterizada por um estado de estresse oxidativo a nível celular [5]. Esse desequilíbrio interrompe a homeostase entre mediadores anti e pró-inflamatórios, levando à produção excessiva de radicais livres que prejudicam ainda mais a resposta imunológica e induzem a morte celular [6].

Além de suas consequências locais, a periodontite pode ter impactos sistêmicos [7]. O tecido periodontal inflamado e ulcerado fornece uma porta de entrada ideal para microrganismos patogênicos. Consequentemente, os mediadores pró-inflamatórios, embora produzidos localmente, são liberados na corrente sanguínea e podem afetar órgãos distantes. Uma ampla gama de citocinas e suas diversas ações são cruciais para a regulação do desenvolvimento biológico e da homeostase na periodontite [3].

Estudos recentes têm se concentrado em opções de tratamento que podem complementar a terapia periodontal básica (isto é, raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais e/ou ultrassônicos) [8] para melhorar parâmetros clínicos, reduzir a carga bacteriana, limitar a progressão destrutiva da doença e mitigar os riscos à saúde sistêmica [9]. Entre essas opções, a terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) tem mostrado resultados promissores em várias áreas da odontologia devido aos seus efeitos na proliferação celular, viabilidade, integridade e reparo do DNA [10,11]. Especificamente nos tecidos periodontais, a LLLT tem demonstrado reduzir a inflamação e a dor [12] e promover o reparo tecidual após procedimentos cirúrgicos [13,14,15]. No entanto, a eficácia dessa terapia depende de vários parâmetros, como o comprimento de onda do laser, a dose de energia aplicada e o estado do tecido irradiado [16].

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de um protocolo de LLLT nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose no tecido gengival, bem como em marcadores de inflamação sistêmica e estresse oxidativo em um modelo animal de periodontite experimental.

3. 1. 2 Materiais e métodos

3.1.2.1 Animais

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos para pesquisa animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que estão em conformidade com os padrões éticos internacionais para pesquisa animal experimental. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES nº 27/2022).

Um total de 48 camundongos C57BL/6 (ambos os sexos, com 16 semanas de idade e peso corporal médio de 25–30 g) foram utilizados. Os camundongos foram alojados em gaiolas de polipropileno sob condições controladas: temperatura mantida a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa a $55\% \pm 10\%$ e ciclo claro/escuro padrão de 12 horas. Ração padrão e água foram fornecidas ad libitum. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Controle (C): sem periodontite; Controle mais LLLT (C+L): sem periodontite tratado com LLLT; Periodontite (P): periodontite induzida por ligadura; Periodontite mais LLLT (P+L): periodontite induzida por ligadura tratada com LLLT.

3.1.2.2 Modelo de periodontite experimental e protocolo LLLT

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (91 mg/kg) e cloridrato de xilazina (9,1 mg/kg) e colocados em uma mesa cirúrgica adaptada para facilitar o acesso à cavidade oral. A periodontite foi induzida por ligadura seguindo o método de Ribeiro et al. (2023) [17]. Resumidamente, um fio de seda 6-0 (Ethicon, EUA) foi laçado ao redor do primeiro molar mandibular direito de cada animal usando espaçadores endodônticos #20 e #25 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Após 28 dias de indução de periodontite, a ligadura foi removida e a raspagem e alisamento radicular (RAR) foi realizada imediatamente usando instrumentos manuais [17]. Após o procedimento de RAR, a LLLT foi realizada. Um laser infravermelho de diodo de arseneto de alumínio e gálio (AlGaAs) (808 nm; MMOptics Ltda, São Carlos, Brasil) foi aplicado na região extraoral da mandíbula adjacente ao primeiro molar direito por 40 segundos em cada sessão, com uma densidade de energia de 4 J/sessão (modo de onda contínua, $\phi \sim 0,03 \text{ cm}^2$, 100 mW, $133,3 \text{ J/cm}^2$) por três dias

consecutivos, totalizando três sessões. A densidade de energia variando entre 1–5 J/cm² é descrita como aquela que possui efeitos positivos em diferentes células e órgãos [18].

3.1.2.3 Coleta e processamento das amostras

Os animais foram eutanasiados por meio de uma overdose de cetamina e xilazina no dia seguinte à terceira aplicação do laser. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Os tecidos gengivais que cobriam a mandíbula direita foram excisados e processados com 1 mL de solução fosfato-salina (PBS) e 2% de soro fetal bovino (SFB), 0,002 g de colagenase II e 10 µL de DNase, depois homogeneizados e incubados por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 µL de EDTA com incubação por 10 minutos. Posteriormente misturados com 11 mL de PBS (2% SFB) e centrifugados (400×g, 10 min). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de PBS (2% SFB), filtradas (70 µm), recentrifugadas (200×g, 5 min) [4] e armazenadas para análise posterior usando citometria de fluxo para avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e taxas de apoptose. Após a remoção do tecido gengival, as mandíbulas foram preparadas para confirmar a perda óssea alveolar. O material orgânico foi extraído das amostras por imersão em hipoclorito de sódio a 3% por quatro semanas. Após essa etapa, as mandíbulas foram enxaguadas com água destilada. As amostras foram secas em estufa a 37°C e armazenadas em ambiente seco [17]. O sangue coletado foi centrifugado e 20 µL de plasma foram reservados para ensaios bioquímicos de avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP). Os níveis de citocinas no plasma também foram medidos usando citometria de fluxo.

3.1.2.4 Confirmação da periodontite experimental

Para confirmar o sucesso do modelo experimental de periodontite, foi realizada a avaliação morfométrica da perda óssea alveolar nas mandíbulas dissecadas e preparadas. Imagens digitalizadas foram obtidas de modo direto em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JEM-6610 LV) seguindo o método descrito por Ribeiro et al. (2023) [17]. A distância linear da junção cimento-esmalte (JCE) até a borda óssea alveolar (ROA) da raiz distal do molar foi medida em micrômetros (µm) por um investigador cego e experiente (IMR) usando o software de domínio público ImageJ [17]. A periodontite foi determinada pela presença de 15% ou mais de perda óssea entre os grupos controle e ligadura. Este critério reflete a classificação atual da doença periodontal em humanos, que estabelece para o diagnóstico de periodontite a existência de perda óssea radiográfica [1].

3.1.2.5 Níveis intracelulares de ROS

A produção de ROS no tecido gengival foi avaliada por meio dos níveis intracelulares de ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), utilizando os marcadores dihidroetídio (DHE) e 2',7'-diacetato dicloro fluoresceína (DCF-DA) respectivamente. A intensidade da mediana de fluorescência resultante da oxidação desses marcadores foi avaliada usando um citômetro de fluxo. Para quantificar a fluorescência emitida, as amostras celulares foram excitadas a 488 nm e os sinais foram capturados usando filtros de 585/42 e 530/30 para DHE e DCF, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada usando um sistema FACSCanto II e analisados

usando o software FACSDIVA (Becton Dickinson) para determinar a intensidade média da fluorescência em 10.000 células [19].

3.1.2.6 Apoptose de células gengivais

Para determinação da apoptose no tecido gengival, aplicamos a marcação com o reagente Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit® (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e do corante vital iodeto de propídeo (PI: Propidium Iodide), seguida de análise em citômetro de fluxo. O PI é um marcador padrão que possui a função de distinguir células viáveis e não viáveis. As células foram excitadas a 488 nm e a fluorescência FITC e PI foram detectadas usando, respectivamente, filtros 530/30 e 585/42. Para cada medição, 10.000 eventos foram realizados. Posteriormente, analisamos os dados fazendo uso do software FACSDiva (Becton Dickinson). A partir do gráfico dot plot obtido, a soma dos quadrantes Q2 e Q4 foram determinados, onde Q2 representa as células apoptóticas iniciais (anexina V positivo e PI negativo) e Q4 representa as células apoptóticas tardias (anexina V positivo e PI positivo). Os dados foram expressos como a porcentagem de células apoptóticas. [19].

3.1.2.7 Avaliação da atividade inflamatória sistêmica e estresse oxidativo

As amostras de plasma foram diluídas em solução tampão fosfato-salina (PBS, 1:80) e testadas em triplicata para medir marcadores de atividade inflamatória sistêmica e de oxidação proteica. O nível de mieloperoxidase (MPO) foi quantificado como um marcador de atividade pró-inflamatória. Em resumo, as amostras de plasma foram transferidas para uma microplaca de fundo chato e a reação bioquímica iniciada pela adição de uma solução de O-dianisidina. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas iMark® (Bio-Rad, Washington, EUA) a um comprimento de onda de 460 nm e os dados foram registrados em intervalos de 15 segundos durante 10 minutos [20]. Os valores plasmáticos de AOPP, como marcador de estresse oxidativo sobre proteínas, foram determinados por espectrofotometria em leitor de microplacas iMark® Absorbance (Bio-Rad, Washington, EUA) e realizados pelo método colorimétrico utilizando a cloramina T. A densidade óptica foi lida de imediato por meio de absorbância no comprimento de onda de 340 nm. A quantificação do AOPP foi obtida por regressão linear aplicando a solução padrão de cloramina T nas concentrações de 5 – 100 µM. Os resultados foram expressos em µM de equivalente de cloramina T [21].

3.1.2.8 Quantificação de citocinas no plasma

As citocinas séricas (IL-6, IL-12p70, IL-10, IFN- γ , TNF e MCP-1) foram quantificadas utilizando o kit CBA Mouse Inflammation (BD Biosciences) por citometria de fluxo (FACSCanto II-BD). As populações de microesferas foram detectadas de acordo com suas intensidades de fluorescência (detector de fluorescência 4 PE, comprimento de onda ~650 nm [FL4 Red]). A fluorescência de 5.000 microesferas por amostra foi lida em gráficos de dispersão de tamanho versus granulidade (FSC vs. SSC). Antes da análise, uma curva padrão foi construída usando o mesmo procedimento, permitindo a determinação das concentrações de citocinas nas amostras de interesse [22].

3.1.3 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A distribuição normal das variáveis foi analisada usando o teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre grupos foram analisadas estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA), de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ (*) foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 8.02 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

3.1.4 Resultados

3.1.4.1 Confirmação do modelo de periodontite experimental

O modelo experimental de periodontite foi validado por meio da medida morfométrica da perda óssea alveolar na raiz distal do molar inferior (face lingual). A Figura 1 mostra as imagens da reabsorção óssea alveolar nos grupos. O grupo P ($625,3 \pm 26,33 \mu\text{m}$) e o grupo P+L ($658,3 \pm 29,01 \mu\text{m}$), apresentaram perda óssea alveolar significativa em relação aos grupos C e C+L ($362,8 \pm 13,87 \mu\text{m}$ e $385,5 \pm 12,51 \mu\text{m}$, $p < 0,05$), respectivamente.

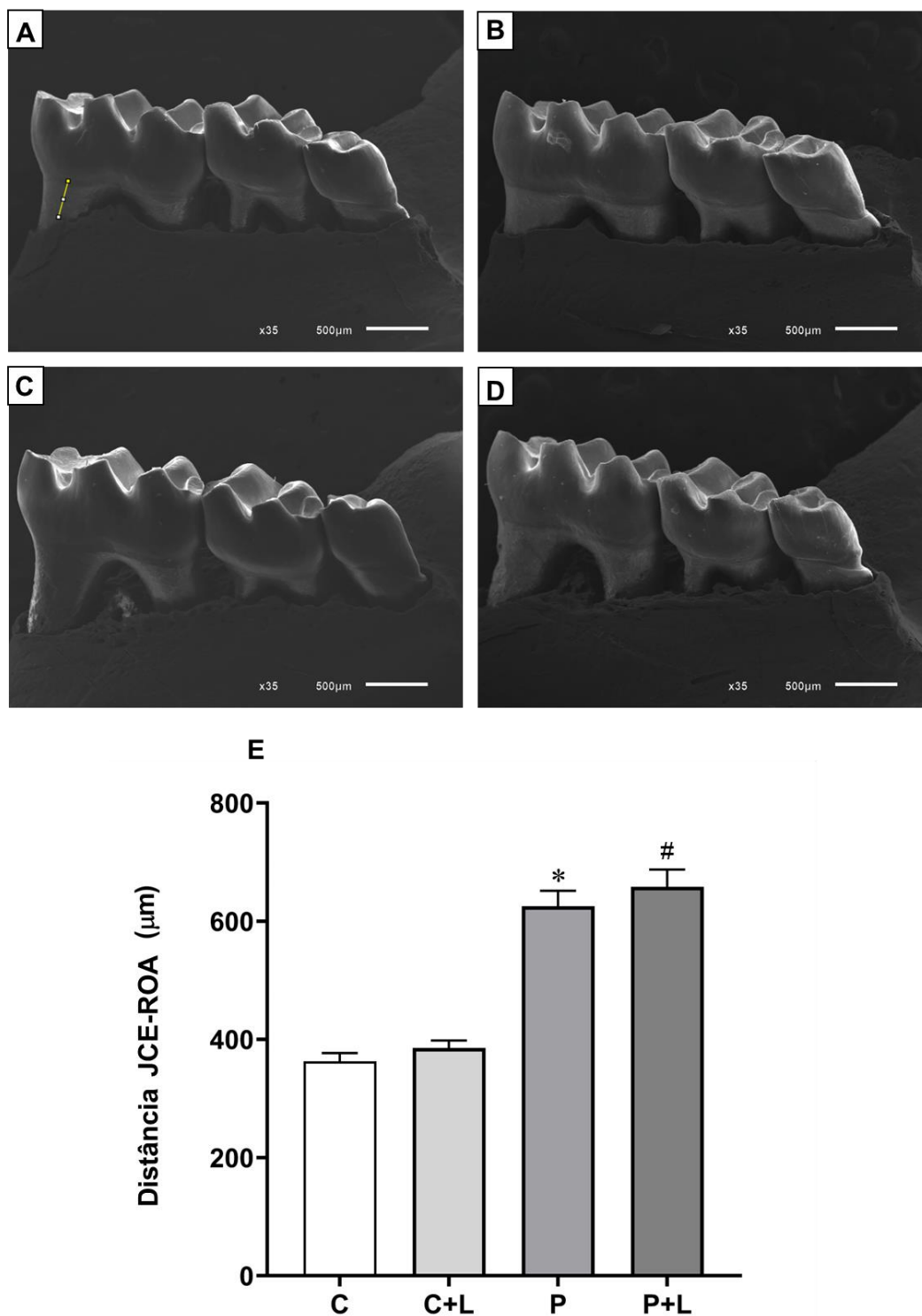


Figura 1. Confirmação da perda óssea alveolar através da medida da distância (μm) entre a junção cimento-esmalte (JCE) e ao rebordo ósseo alveolar (ROA) nos grupos experimentais (linha amarela). As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura foram adquiridas em modo direto (aumento de 35X, barra de escala: 500 μm). A) Grupo C (controle); B) Grupo C+L (controle + LLLT); C) Grupo P (periodontite) e D) Grupo P+L (periodontite + LLLT). E) Gráfico de barras representativo da perda óssea alveolar (μm) nos grupos experimentais. Os valores são apresentados como a média \pm EPM (ANOVA one-way, teste post-hoc de Tukey, $n=12$). * $p<0,05$ vs. grupos C e C+L. # $p<0,05$ vs. grupos C e C+L.

3.1.4.2 LLLT reduz a produção de ROS e apoptose em células gengivais

Para avaliar o efeito da LLLT na produção de ROS no tecido gengival, os níveis de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio foram avaliados usando os marcadores de fluorescência DHE e DCF, respectivamente. A Figura 2a mostra que o grupo P teve um aumento na produção de superóxido ($1338 \pm 33,25$ MIF u.a, $p < 0,05$) em comparação com o grupo C ($958,2 \pm 46,76$ MIF u.a) e o grupo C+L ($1040 \pm 372,8$ MIF u.a). A LLLT reduziu significativamente os níveis de superóxido no grupo P+L ($1087 \pm 65,52$ MIF u.a) em comparação com o grupo P ($p < 0,05$). Observamos que os níveis de peróxido de hidrogênio (Figura 2b) também aumentaram significativamente no grupo P ($1340 \pm 155,0$ MIF u.a, $p < 0,05$) em comparação com o grupo C ($925,0 \pm 30,23$ MIF u.a) e o grupo C+L ($1003 \pm 56,31$ MIF u.a). O tratamento com LLLT foi capaz de reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio no grupo P+L ($992,8 \pm 10,43$ MIF u.a) em comparação com o grupo P, $p < 0,05$.

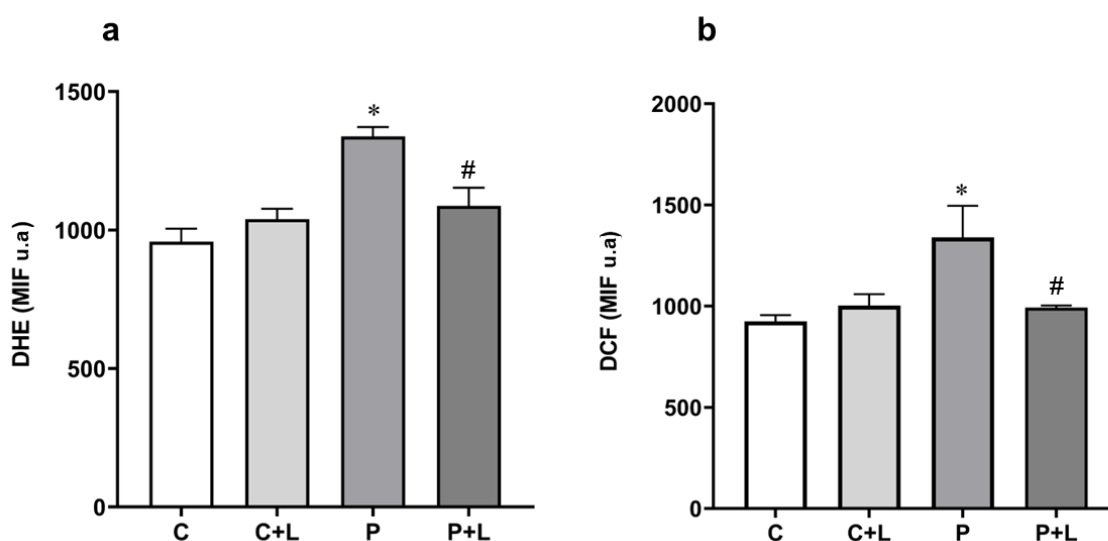


Figura 2. Níveis de DHE (a) e DCF (b) nos grupos experimentais. Os dados foram expressos como a mediana da intensidade de fluorescência emitida (MFI). Os resultados estão apresentados como a média \pm EPM (ANOVA one-way, teste post-hoc de Tukey, $n=5-6$). * $p < 0,05$ vs. C, C+L e P+L. # $p < 0,05$ vs. P.

A apoptose das células gengivais também foi analisada. A Figura 3 mostra que a periodontite aumentou significativamente a taxa de apoptose das células gengivais ($5,578 \pm 0,4431\%$, $p < 0,05$) em comparação com o grupo C ($3,345 \pm 0,2450\%$) e o grupo C+L ($2,676 \pm 0,5875\%$). A LLLT foi muito eficaz em evitar a apoptose das células gengivais, como mostrado no grupo P+L ($3,782 \pm 0,3591\%$, $p < 0,05$).

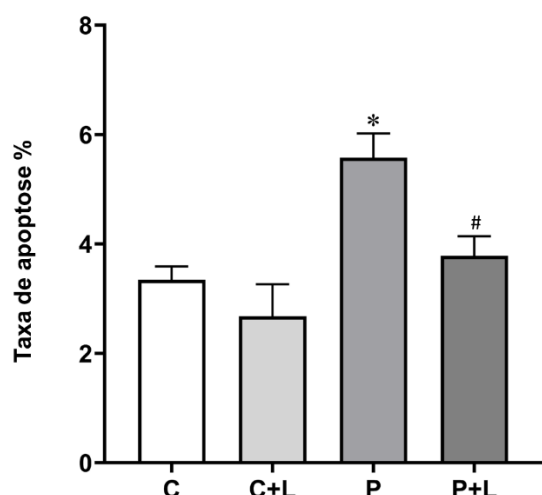


Figura 3. Taxa de apoptose de células gengivais (%) nos grupos experimentais. Os valores são apresentados como a média \pm EPM (ANOVA one-way, teste post-hoc de Tukey, $n=5-6$). * $p<0,05$ vs. C, C+L e P+L. # $p<0,05$ vs. P.

3.1.4.3 Potenciais efeitos sistêmicos anti-inflamatórios e antioxidantes da LLLT

Para avaliar o impacto da LLLT na atividade inflamatória sistêmica, a atividade da MPO foi analisada. Esta enzima ocorre abundantemente em neutrófilos e contribui para o dano tecidual na inflamação. A Figura 4a mostra que a atividade sistêmica da MPO foi significativamente aumentada no grupo P ($0,02623 \pm 0,006534$ mU/ml, $p<0,05$) em comparação com os grupos C e C+L ($0,008850 \pm 0,001308$ mU/ml e $0,01509 \pm 0,002361$ mU/ml, respectivamente). A LLLT aplicada à área periodontal foi muito eficaz em diminuir a MPO no grupo P+L ($0,01331 \pm 0,002580$ mU/ml, $p<0,05$ vs. grupo P) para níveis comparáveis aos dos grupos controle.

A Figura 4b mostra os resultados da produção de estresse oxidativo sistêmico nos grupos experimentais. A periodontite aumentou significativamente o estresse oxidativo, medido pela produção de AOPP no grupo P ($184,8 \pm 15,01$ $\mu\text{mol/L}$, $p<0,05$) em comparação com os grupos C ($125,2 \pm 11,95$ $\mu\text{mol/L}$) e C+L ($79,40 \pm 7,167$ $\mu\text{mol/L}$). O protocolo de LLLT foi eficaz em diminuir os níveis de estresse oxidativo no grupo P+L ($113,5 \pm 10,29$ $\mu\text{mol/L}$, $p<0,05$) em comparação com o grupo periodontite.

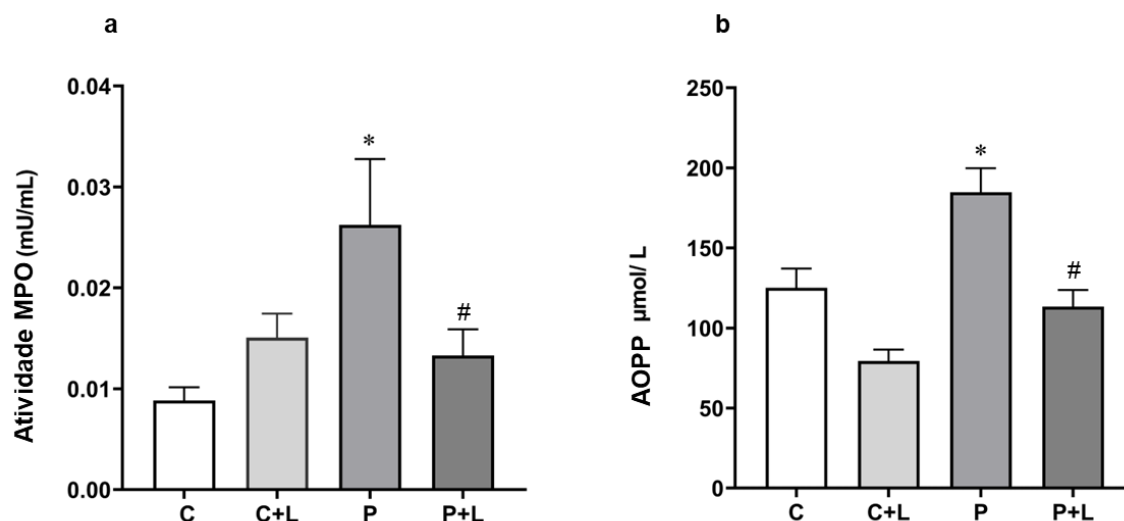


Figura 4. a) Atividade plasmática da enzima pró-inflamatória mieloperoxidase (MPO) (mU/mL) e b) Níveis dos produtos avançados de oxidação de proteínas (AOPP) nos grupos experimentais ($\mu\text{mol/L}$). Os valores são apresentados como a média \pm EPM (ANOVA one-way, teste post-hoc de Tukey, $n=6-12$). * $p<0,05$ vs. C, C+L e P+L. # $p<0,05$ vs. P.

Os níveis plasmáticos de citocinas nos grupos experimentais são apresentados na Tabela 1. As citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12p70 foram significativamente aumentadas e o nível da citocina anti-inflamatória IL-10 foi significativamente diminuída no grupo P em comparação com os grupos C e C+L. O tratamento com LLLT reverteu significativamente esses níveis no grupo P+L ($p<0,05$). Nenhuma diferença entre os grupos experimentais foi observada para os níveis de IFN- γ , TNF e MCP-1.

Tabela 1. Níveis de citocinas plasmáticas dos grupos experimentais

Grupos/ Parâmetros	C	C+L	P	P+L
IL-6	5,49 \pm 0,29	5,83 \pm 0,25	6,99 \pm 0,27*	4,66 \pm 0,22#
IL-12p70	16,94 \pm 1,63	15,62 \pm 0,31	24,36 \pm 1,32*	18,54 \pm 0,93#
IL-10	20,57 \pm 0,84	20,46 \pm 0,90	17,83 \pm 0,30*	23,17 \pm 0,36#
IFN- γ	2,00 \pm 0,08	2,06 \pm 0,25	2,23 \pm 0,16	2,33 \pm 0,30
TNF	17,70 \pm 0,42	15,20 \pm 0,33	16,68 \pm 0,77	16,97 \pm 0,70
MCP-1	48,83 \pm 1,28	46,69 \pm 2,35	55,61 \pm 5,61	50,83 \pm 0,73
IL-6/IL-10	0,25 \pm 0,02	0,27 \pm 0,00	0,39 \pm 0,02*	0,20 \pm 0,01#

Os dados foram expressos como média \pm EPM (pg/mL). ANOVA one-way, teste post-hoc de Tukey, $n=3-5$. * $p<0,05$ vs. C, C+L e P+L. # $p<0,05$ vs. P.

3.1.5 Discussão

A terapia com laser de baixa intensidade é uma técnica não invasiva que tem sido investigada como uma opção de tratamento vantajosa para várias condições orais, incluindo as doenças periodontais [13]. Nossos achados demonstraram que, no modelo experimental utilizado, a terapia com laser de baixa intensidade atenuou a produção de espécies reativas de oxigênio e a apoptose no tecido gengival, além de reduzir a inflamação sistêmica e o estado pró-oxidante. Enquanto alguns estudos utilizaram o tecido gengival em modelos experimentais de periodontite para avaliar parâmetros inflamatórios e oxidativos [4,23], este é o primeiro estudo a analisar os níveis do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e a porcentagem de apoptose em tecidos

gingivais afetados pela periodontite e avaliar o impacto de um protocolo adjunto de LLLT, o que contextualiza nosso trabalho como um importante marco de pesquisa.

A modulação dos processos inflamatórios e oxidativos nos tecidos periodontais por meio do potencial antioxidante da LLLT sugere um efeito protetor da terapia a laser contra danos celulares e teciduais na periodontite [18,24,25]. Nossa avaliação de ROS no tecido gengival demonstrou que a LLLT foi capaz de reduzir os níveis desses marcadores em comparação com o grupo não tratado, e alinha-se com estudos anteriores *in vitro* que detectaram reduções nos níveis de ROS [18,24,25]. No entanto, é importante notar que Rupel et al. (2018b) [16] relataram que um comprimento de onda menor do que o utilizado em nosso estudo não causa efeito em células expostas a lipopolissacarídeos (LPS) e pode aumentar os níveis de ROS em células saudáveis. Além disso, Chen et al. (2011) [26] e Wang et al. (2022) [27] relataram que altas densidades de energia do laser podem levar a um aumento na liberação de ROS, devido a resposta em dose bifásica relacionada à LLLT [28].

Neutrófilos e macrófagos produzem ânions superóxido como parte do mecanismo de defesa contra patógenos, e níveis elevados alteram a organização tecidual na periodontite. Nosso resultado mostrou a regulação do ânion superóxido pela LLLT, o que pode sugerir uma modulação na resposta imunológica, ao reduzir os níveis de ROS, minimizando o dano tecidual e controlando a inflamação crônica. A partir desta resposta, a preservação da integridade dos tecidos periodontais e a manutenção da homeostase oral poderia ser alcançada [29].

Apesar dos efeitos positivos da LLLT observados em estudos experimentais e *in vitro* [16,17,24,25,30], estudos clínicos demonstrando o potencial para reduzir o estresse oxidativo em tecidos periodontais ainda são escassos. Observamos que, no grupo tratado com LLLT, os níveis de apoptose permaneceram menores do que no grupo de animais com periodontite tratados apenas com terapia periodontal básica. A modulação de ROS diminui a apoptose, facilitando assim o reparo dos tecidos afetados [31]. Faria et al. (2020) [32] confirmaram que a LLLT coordena mudanças morfológicas, moleculares e bioquímicas dentro da célula para produzir um efeito reparador, por meio da regulação de proteínas relacionadas a morte celular, que são capazes de modificar a permeabilidade externa da mitocôndria, regulando a via intrínseca e extrínseca da apoptose.

Em um momento em que novas perspectivas estão surgindo sobre o papel da disfunção mitocondrial na periodontite [33,34], a LLLT parece desempenhar um papel crucial como um adjuvante às terapias periodontais convencionais, já que a ação do laser de baixa intensidade pode interferir na regulação de ROS em células e tecidos sob oxidação [26,28,35]. Isso sugere que a LLLT tem o potencial de regular os mecanismos celulares subjacentes, que contribuem para a periodontite e pode melhorar a eficácia das estratégias do tratamento convencional. O laser, absorvido pela mitocôndria, por meio da citocromo C oxidase, pode aumentar a atividade enzimática, elevando o consumo de oxigênio e estimulando a síntese de adenosina trifosfato (ATP), por meio da fotodissociação do óxido nítrico inibitório. É provável que a produção de superóxido nas mitocôndrias ative a superóxido dismutase (SOD) convertendo-a em peróxido de hidrogênio, que pode atravessar as membranas das mitocôndrias e ativar vias de sinalização benéficas. A modulação de ROS pela LLLT, envolvendo mecanismos anti-inflamatórios, talvez não seja a única explicação. Outras vias de sinalização, como as do óxido nítrico, AMP cíclico e cálcio, também podem desempenhar um provável papel na redução da inflamação, o que ainda requer esclarecimentos [35].

Nossa investigação revelou uma redução nos níveis de atividade inflamatória e oxidação proteica, indicando o potencial anti-inflamatório e antioxidante sistêmico da LLLT na periodontite. Estudos experimentais examinando o efeito da LLLT na atividade da MPO na periodontite relataram achados semelhantes aos nossos

[17,30,36,]. Níveis elevados de AOPP geralmente significam estresse oxidativo avançado e estão ligados a várias condições inflamatórias crônicas sistêmicas [37]. Além disso, pesquisa anterior de Rupel & Ottaviani (2018a) [38] demonstrou uma redução nos níveis de AOPP no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes submetidos ao tratamento periodontal associado à LLLT. Esses achados ressaltam os potenciais benefícios sistêmicos da LLLT como uma terapia adjunta para a periodontite, que pode ser uma abordagem terapêutica interessante em pacientes com periodontite e doenças crônicas estabelecidas. Observamos um efeito modulador da LLLT nas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória, caracterizado por uma redução nos níveis de IL-6 e IL-12p70 e um aumento nos níveis de IL-10. Além disso, notamos uma diferença significativa na razão IL-6/IL-10, indicando um potencial efeito anti-inflamatório sistêmico em nosso modelo experimental. Esta redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias fornece mais evidências do papel da LLLT na modulação da inflamação. A LLLT pode promover a modulação nas principais células da resposta inflamatória, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, inibindo vias de sinalização pró-inflamatórias, regulando o estresse oxidativo, a produção de ROS, aumentando a microcirculação sanguínea e a oxigenação tecidual que, por meio destas modificações, altera o perfil e a resposta inflamatória [18,35]. Estudos *in vitro* anteriores [39,40] demonstraram o efeito regulador benéfico da LLLT na secreção de citocinas, alterando-a de um perfil pró-inflamatório para um anti-inflamatório. No entanto, estudos clínicos relataram resultados divergentes em relação ao efeito da LLLT nos níveis de citocinas no contexto do tratamento periodontal, com diferentes protocolos de aplicação. Enquanto um estudo relatou achados semelhantes aos nossos [41], outros descreveram uma ausência de efeito da LLLT na regulação das citocinas [42,43], ressaltando a necessidade de mais pesquisas.

Os resultados que obtivemos no grupo com periodontite estão alinhados com achados de estudos anteriores [33,34,37] em relação aos mecanismos de estresse oxidativo envolvidos na progressão da doença. Níveis aumentados de ROS, incluindo peróxido de hidrogênio, contribuem para a disfunção mitocondrial [33], morte celular [44] e perda de inserção periodontal clínica [37]. O estresse oxidativo também envolve citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, como IL-6 e IL-12 [45].

A metodologia empregada, com a eutanásia um dia após a última aplicação do laser, não permitiu avaliar o potencial efeito terapêutico do laser frente ao reparo ósseo. No entanto, com base nos efeitos benéficos observados nas células gengivais, futuras investigações são necessárias para elucidar o efeito deste protocolo de LLLT no reparo ósseo frente ao desafio da periodontite experimental.

O protocolo de LLLT utilizado em nosso estudo atingiu uma dose de ação efetiva para apenas alguns dos parâmetros de interesse. No entanto, o desafio de alcançar uma dose anti-inflamatória ideal e estimular a homeostase fisiológica permanece uma fragilidade da terapia com laser de baixa intensidade [46], dada sua dose-resposta bifásica [28] e sua capacidade de alterar os mecanismos de defesa do hospedeiro dependendo da dose, tempo de exposição e intensidade de energia [16,28]. Nossos achados fornecem mais evidências do papel promissor da LLLT como um adjuvante à terapia periodontal convencional. A LLLT tem o potencial de mitigar tanto os processos inflamatórios locais quanto sistêmicos envolvidos na patogênese da periodontite.

3.1.7 Conclusão

No modelo experimental de periodontite utilizado neste estudo, o protocolo com laser de baixa intensidade demonstrou um efeito benéfico nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da periodontite. Observamos reduções nos níveis de espécies reativas de oxigênio e apoptose em células gengivais,

juntamente com melhorias nos parâmetros séricos, sugerindo um benefício sistêmico associado da LLLT. O potencial anti-inflamatório e antioxidante encontrado neste estudo, demonstra que esta terapia é promissora para ser utilizada como coadjuvante à terapia periodontal. No entanto, mais pesquisas são necessárias para validar esse potencial. Investigações futuras usando modelos clínicos são necessárias para confirmar tanto os efeitos locais quanto sistêmicos da LLLT no tratamento da periodontite. Além disso, esforços devem ser feitos para estabelecer os mecanismos de ação através dos quais os efeitos da LLLT são exercidos e potencialmente expandir a aplicabilidade clínica nos cuidados periodontais.

Fontes de financiamento

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, número 311938/2021-3) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES, número 51028.788.21531.25082022).

Declaração de contribuição de autoria (CRediT)

Larissa Trarbach Figueiredo Braga: Investigação, Metodologia, Validação, Análise formal, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição. Isadora Martins Ribeiro: Investigação, Metodologia, Redação - revisão e edição. Maria Eduarda de Souza Barroso: Investigação, Análise formal, Redação - revisão e edição. Edgar Hell Kampke: Investigação, Análise formal. Lorena Nascimento Santos Neves, Sara Cecília de Andrade, Guilherme Heleodoro Barbosa: Investigação, Metodologia. Marcella Leite Porto: Conceituação, Investigação, Metodologia, Curadoria de dados, Redação - revisão e edição. Silvana Santos Meyrelles: Conceituação, Metodologia, Recursos, Curadoria de dados, Redação - revisão e edição, Supervisão.

Declaração de interesse

Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Análises Biomoleculares Multiusuário (LABIOM) e ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), e ao Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES).

Referências

1. Papapanou, P. N., Sanz, M., et al. (2018) Periodontitis: Consensus report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 45(Suppl 20): S162–S170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>

2. World Health Organization. (2022). Global oral health status report: Towards universal health coverage for oral health by 2030. World Health Organization. Retrieved December 1, 2022, from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>
3. Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 15(1): 30-44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
4. Mizraji, G., Segev, H., Wilensky, A., & Hovav, A. H. (2013). Isolation, processing and analysis of murine gingival cells. *J Vis Exp* (77): e50388. <https://doi.org/10.3791/50388>
5. Fu, X., Liu, B., Sun, J., Zhang, X., Zhu, Z., Wang, H., Xiao, A., & Gan, X. (2023). Perturbation of mitochondrial dynamics links to the aggravation of periodontitis by diabetes. *J Histotechnol* 46(3):139-150. <https://doi.org/10.1080/01478885.2023.2188705>
6. Wang, Y., Andrukhov, O., & Rausch-Fan, X. (2017). Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Front Physiol* 8:910. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00910>
7. Chatzopoulos, G. S., Jiang, Z., Marka, N., & Wolff, L. F. (2023). Periodontal disease, tooth loss, and systemic conditions: An exploratory study. *Int Dent J*. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2023.08.002>
8. Theodoro, L. H., Marcantonio, R. A. C., Wainwright, M., & Garcia, V. G. (2021). LASER in periodontal treatment: Is it an effective treatment or science fiction? *Braz Oral Res* 35(Suppl 2):e099. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0099>
9. Sedghi, L. M., Bacino, M., & Kapila, Y. L. (2021). Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Front Cell Infect Microbiol* 11:766944. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.766944>
10. Musstaf, R. A., Jenkins, D. F. L., & Jha, A. N. (2019). Assessing the impact of low-level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *Int J Radiat Biol* 95(2):120-143. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1524944>
11. Marques, M. M., Diniz, I. M., de Cara, S. P., Pedroni, A. C., Abe, G. L., D'Almeida-Couto, R. S., Lima, P. L., Tedesco, T. K., & Moreira, M. S. (2016). Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg* 34(11):500-508. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4038>
12. Shakoush, G., Albonni, H., & Almahdi, W. (2023). Low-level laser therapy has an additional effect with open flap debridement on the treatment of stage III periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. *Quintessence Int* 54(4): 274-286. <https://doi.org/10.3290/j.qi.b3666941>
13. Gholami, L., Asefi, S., Hooshyarfard, A., Sculean, A., Romanos, G. E., Aoki, A., & Fekrazad, R. (2019). Photobiomodulation in periodontology and implant dentistry: Part 1. Photobiomodul *Photomed Laser Surg* 37(12):739-765. <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4710>
14. Dompe, C., Moncrieff, L., Matys, J., Grzech-Leśniak, K., Kocherova, I., Bryja, A., Bruska, M., Dominiak, M., Mozdziak, P., Skiba, T. H. I., Shibli, J. A., Angelova Volponi, A., Kempisty, B., & Dyszkiewicz-Konwińska, M. (2020). Photobiomodulation-underlying mechanism and clinical applications. *J Clin Med* 9(6):1724. <https://doi.org/10.3390/jcm9061724>

15. Le, J. M., Wu, J. H., Jaw, F. S., & Su, C. T. (2023). The effect of bone remodeling with photobiomodulation in dentistry: a review study. *Lasers Med Sci* 38(1):265. <https://doi.org/10.1007/s10103-023-03933-9>
16. Rupel, K., Zupin, L., Colliva, A., Kamada, A., Poropat, A., Ottaviani, G., Gobbo, M., Fanfoni, L., Gratton, R., Santoro, M., Di Lenarda, R., Biasotto, M., & Zacchigna, S. (2018b). Photobiomodulation at Multiple Wavelengths Differentially Modulates Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 6510159. <https://doi.org/10.1155/2018/6510159>
17. Ribeiro, I. M., de Souza Barroso, M. E., Kampke, E. H., Braga, L. T. F., Campagnaro, B. P., & Meyrelles, S. D. S. (2023). Infrared laser therapy decreases systemic oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic mice with periodontitis. *Lipids Health Dis* 22(1):171. <https://doi.org/10.1186/s12944-023-01934-9>
18. Kocherova, I., Bryja, A., Błochowiak, K., Kaczmarek, M., Stefańska, K., Matys, J., Grzech-Leśniak, K., Dominiak, M., Mozdziak, P., Kempisty, B., & Dyszkiewicz-Konwińska, M. (2021). Photobiomodulation with red and near-infrared light improves viability and modulates expression of mesenchymal and apoptotic-related markers in human gingival fibroblasts. *Materials (Basel)* 14(12):3427. <https://doi.org/10.3390/ma14123427>
19. Campagnaro, B. P., Tonini, C. L., Doche, L. M., Nogueira, B. V., Vasquez, E. C., & Meyrelles, S. S. (2013). Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. *DNA Cell Biol* 32(8):458-466. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2065>
20. Bradley, P. P., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60(3):618-622.
21. Ozenirler, S., Erkan, G., Konca Degertekin, C., Ercin, U., Cengiz, M., Bilgihan, A., Yilmaz, G., & Akyol, G. (2014). The relationship between advanced oxidation protein products (AOPP) and biochemical and histopathological findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis* 15(3):131-136. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12113>
22. Chen, R., Lowe, L., Wilson, J. D., Crowther, E., Tzeggai, K., Bishop, J. E., & Varro, R. (1999). Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem* 45(9):1693-1694.
23. Marchesan, J., Girnary, M. S., Jing, L., Miao, M. Z., Zhang, S., Sun, L., Morelli, T., Schoenfisch, M. H., Inohara, N., Offenbacher, S., & Jiao, Y. (2018). An experimental murine model to study periodontitis. *Nat Protoc* 13(10):2247–2267. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0035-4>
24. Huang, Y. Y., Nagata, K., Tedford, C. E., McCarthy, T., & Hamblin, M. R. (2013). Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. *J Biophotonics* 6(10):829-838. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200157>
25. Mostafavinia, A., Ahmadi, H., Amini, A., Roudafshani, Z., Hamblin, M. R., Chien, S., & Bayat, M. (2021). The effect of photobiomodulation therapy on antioxidants and oxidative stress profiles of adipose-derived mesenchymal stem cells in diabetic rats. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 262:120157. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120157>

26. Chen, A.C., Arany, P.R., Huang, Y.Y., Tomkinson, E.M., Sharma, S.K., Kharkwal, G.B., Saleem, T., Mooney, D., Yull, F.E., Blackwell, T.S., & Hamblin, M.R. (2011). Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE* 6(7):e22453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022453>
27. Wang, L., Liu, C., Song, Y., Wu, F. (2022). The effect of low-level laser irradiation on the proliferation, osteogenesis, inflammatory reaction, and oxidative stress of human periodontal ligament stem cells under inflammatory conditions. *Lasers Med Sci* 37(9):3591–3599. <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03638-5>
28. Huang, Y.Y., Sharma, S.K., Carroll, J., & Hamblin, M.R. (2011). Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response* 9(4):602-18. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>
29. El-Benna, J., Dang, P.M.-C., & Gougerot-Pocidallo, M.-A. (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in Immunopathology*, 30(3), 279–289. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0118-3>
30. Uslu, M. Ö., Eltas, A., Marakoğlu, İ., Dündar, S., Şahin, K., & Özeran, İ. H. (2018). Effects of diode laser application on inflammation and MPO in periodontal tissues in a rat model. *J Appl Oral Sci* 26:e20170266. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0266>
31. Li, S., & Tao, G. (2023). Perish in the attempt: Regulated cell death in regenerative and nonregenerative tissue. *Antioxid Redox Signal* 39(16-18):1053-1069 <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0166>
32. Faria, L. V., Andrade, I. N., dos Anjos, L. M. J., et al. (2020). Photobiomodulation can prevent apoptosis in cells from mouse periodontal ligament. *Lasers Med Sci* 35(8):1841-1848. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-02978-8>
33. Jiang, W., Wang, Y., Cao, Z., Chen, Y., Si, C., Sun, X., & Huang, S. (2023). The role of mitochondrial dysfunction in periodontitis: From mechanisms to therapeutic strategy. *J Periodontal Res* 58(5): 853-863. <https://doi.org/10.1111/jre.13152>
34. Deng, Y., Xiao, J., Ma, L., Wang, C., Wang, X., Huang, X., & Cao, Z. (2024). Mitochondrial Dysfunction in Periodontitis and Associated Systemic Diseases: Implications for Pathomechanisms and Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 25(2):1024. <https://doi.org/10.3390/ijms25021024>
35. Hamblin, M. R. (2017). Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* 4(3):337–361. <https://doi.org/10.3934/biophys.2017.3.337>
36. Wei, P.-F., Ho, K.-Y., Ho, Y.-P., Wu, Y.-M., Yang, Y.-H., & Tsai, C.-C. (2004). The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase, and interleukin-1 β in gingival crevicular fluid: Implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *J Periodontal Res* 39(5): 287–293. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00744.x>
37. Melough, M. M., Sun, X., & Chun, O. K. (2017). The Role of AOPP in Age-Related Bone Loss and the Potential Benefits of Berry Anthocyanins. *Nutrients* 9(7):789. <https://doi.org/10.3390/nu9070789>

38. Rupel, K., & Ottaviani, G. (2018a). Changes in clinical and oxidative stress parameters in periodontal pockets treated with laser therapy: a preliminary split-mouth study. *Lasers Surg Med* 50(4):365-366. <https://doi.org/10.1002/lsm.22814>
39. Papadelli, A., Kyriakidou, K., Kotsakis, G. A., Pepelassi, E., Kallis, A., Vrotsos, I. A., & Karoussis, I. K. (2021). Immunomodulatory effects of Nd:YAG (1064 nm) and diode laser (810 nm) wavelengths to LPS-challenged human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol* 122:104982. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104982>
40. Tian, T., Wang, Z., Chen, L., Xu, W., Wu, B. (2023). Photobiomodulation activates undifferentiated macrophages and promotes M1/M2 macrophage polarization via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Lasers Med Sci* 38(1):86. <https://doi.org/10.1007/s10103-023-03753-x>
41. Sağlam, M., Kantarci, A., Dundar, N., Hakki, S. S. (2014). Clinical and biochemical effects of diode laser as an adjunct to nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 29(1):37-46. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1230-0>
42. Gündoğar, H., Şenyurt, S. Z., Erciyas, K., Yalım, M., & Üstün, K. (2016). The effect of low-level laser therapy on non-surgical periodontal treatment: A randomized controlled, single-blind, split-mouth clinical trial. *Lasers Med Sci* 31(9):1767-1773. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2047-z>
43. Gur, A. T., Guncu, G. N., Akman, A. C., Pinar, A., Karabulut, E., & Nohutcu, R. M. (2022). Evaluation of GCF IL-17, IL-10, TWEAK, and sclerostin levels after scaling and root planing and adjunctive use of diode laser application in patients with periodontitis. *J Periodontol* 93(8):1161-1172. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0494>
44. Costa, F. P. D., Puty, B., Nogueira, L. S., Mitre, G. P., Santos, S. M. D., Teixeira, B. J. B., Kataoka, M. S. D. S., Martins, M. D., Barboza, C. A. G., Monteiro, M. C., Rogez, H., Oliveira, E. H. C., & Lima, R. R. (2019). Piceatannol increases antioxidant defense and reduces cell death in human periodontal ligament fibroblast under oxidative stress. *Antioxidants (Basel)* 9(1):16. <https://doi.org/10.3390/antiox9010016>
45. Porto, M. L., Rodrigues, B. P., Menezes, T. N., Ceschim, S. L., Casarini, D. E., Gava, A. L., Pereira, T. M., Vasquez, E. C., Campagnaro, B. P., & Meyrelles, S. S. (2015). Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *J Biomed Sci* 22:97. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0201-8>
46. Monteiro, M. M., Amorim Dos Santos, J., Paiva Barbosa, V., Rezende, T. M. B., Guerra, E. N. S. (2024). Photobiomodulation effects on fibroblasts and keratinocytes after ionizing radiation and bacterial stimulus. *Arch Oral Biol* 159:105874. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105874>

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo deste estudo, foi possível alcançar importantes avanços na compreensão da ação do laser sobre o tecido periodontal, utilizando o modelo animal escolhido. No entanto, algumas limitações e dificuldades surgiram durante a pesquisa, que merecem destaque e consideração para estudos futuros.

A implementação do modelo animal apresentou desafios técnicos e logísticos. A manipulação e o cuidado dos animais exigiram um rigoroso controle para garantir a validade dos resultados (figura 5). Apesar disso, algumas variáveis tais como diferenças individuais entre os animais, diminuta dimensão, escassa quantidade de material biológico, calibração da dosagem anestésica, utilização de diferentes espaços físicos para análise das amostras, não foram possíveis de serem controladas com precisão, o que podem ter influenciado o desenvolvimento do estudo.

A escolha do modelo animal foi baseada em sua relevância para a replicabilidade dos resultados em contextos clínicos humanos. A sequência de pesquisas realizadas pelo laboratório, iniciado em um modelo experimental com hipercolesterolemia, estabeleceu uma base sólida para a escolha do modelo atual. Este enfoque progressivo, a partir da análise sistêmica anterior, para a análise local, diga-se no tecido periodontal, permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na periodontite e a avaliação do potencial terapêutico do laser (figura 6).

Devido às restrições de tempo e recursos, não foi possível prolongar a aplicação do laser, por um período maior, o que poderia fornecer dados mais robustos e conclusivos sobre a sua eficácia na prevenção da perda óssea alveolar, por exemplo. Nesse sentido, recomenda-se que futuros estudos considerem a inclusão de um maior número de grupos experimentais, maior tempo de resposta para análise do reparo ósseo, análise de diferentes dosagens e frequências de aplicação do laser, que podem contribuir para um entendimento mais abrangente dos seus efeitos e suas aplicações.

Apesar das dificuldades enfrentadas, o estudo abriu novas portas e oportunidades. A apresentação do trabalho em eventos não só validou a relevância da pesquisa, mas também proporcionou a visibilidade internacional do trabalho desenvolvido pelo laboratório. Além disso, o envolvimento de alunos de iniciação científica no projeto contribuiu para a formação de novos pesquisadores e ampliou o

impacto educativo da pesquisa. A superação dos desafios técnicos e logísticos reforçou a capacidade dos participantes em conduzir estudos complexos e de alta relevância científica. Este trabalho também proporcionou perspectivas para futuras colaborações internacionais, promovendo a troca de conhecimento e a inovação contínua.

Como desafios futuros destacamos a importância de reforçar o controle das variáveis para minimizar a influência de fatores externos nos resultados. E a análise de longo prazo, por meio de estudos de longa duração para avaliar os efeitos a longo prazo da LLLT, especialmente na prevenção da perda óssea alveolar.

A continuidade desta linha de pesquisa é fundamental para o avanço do conhecimento nas áreas de fisiologia, odontologia, periodontia e terapias com laser de baixa potência. A sequência de estudos permite a construção de um entendimento mais completo da eficácia das intervenções propostas. Manter essa linha de pesquisa ativa contribuirá não apenas para descobertas científicas, mas também para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que podem beneficiar diretamente a prática clínica.

REFERÊNCIAS GERAIS

BARTOLD, P. M.; WALSH, L. J.; NARAYANAN, A. S. Molecular and cell biology of the gingiva. **Periodontology**, v. 24, p. 28–55, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240103.x>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Geral de Saúde Bucal. (2011). SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde.

CHAPPLE, I.L.C.; MEALEY, B.L. *et al.* Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Periodontology**, v. 89, n. 1, p.S74-84, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>

COSTA, F. P. D. *et al.* Piceatannol increases antioxidant defense and reduces cell death in human periodontal ligament fibroblast under oxidative stress. **Antioxidants (Basel)**, v. 9, n. 1, p. 16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox9010016>

DENG, Y.; XIAO, J.; MA, L.; WANG, C.; WANG, X.; HUANG, X.; CAO, Z. Mitochondrial dysfunction in periodontitis and associated systemic diseases: Implications for pathomechanisms and therapeutic strategies. **Int J Mol Sci.**, v. 25, n. 2, p. 1024, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25021024>

DOMPE, C. *et al.* Photobiomodulation-underlying mechanism and clinical applications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1724, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm9061724>

GHOLAMI, L. *et al.* The Effect of Laser Photobiomodulation on Periodontal Ligament Stem Cells. **Photochem Photobiol**, v. 97, n. 4, p. 851-859, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/php.13367>

GRAVES, D. T.; KANG, J.; ANDRIANKAJA, O.; WADA, K.; ROSSA, C. Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Front Oral Biol**, v. 15, p. 117-132, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000329675>.

GREBU, M. *et al.* Autophagy, One of the Main Steps in Periodontitis Pathogenesis and Evolution. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 1-16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25184338>

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337-361, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337>

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30-44, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3785>

MARCHESAN, J. *et al.* An experimental murine model to study periodontitis. **Nature Protocols**, v. 13, n. 10, p. 2247–2267, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0035-4>

MUSSTTAF, R. A.; JENKINS, D. F. L., JHA, A. N. Assessing the impact of low level laser therapy (LLL) on biological systems: a review. **International Journal of Radiation Biology**, v. 95, n. 2, p. 120-143, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1524944>

PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; *et al.* Periodontitis: Consensus report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, Suppl 20, p. S162–S170, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>

QADRI, T. *et al.* Role of Diode Lasers (800–980 Nm) as Adjuncts to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Systematic Review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n.11, p. 568-575, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/pho.2015.3914>

THEODORO, L. H.; MARCANTONIO, R. A. C.; WAINWRIGHT, M.; GARCIA, V. G. LASER in periodontal treatment: Is it an effective treatment or science fiction? **Brazilian Oral Research**, v. 35, Suppl 2, p. e099, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0099>.

VAN DYKE, T. E. Shifting the paradigm from inhibitors of inflammation to resolvers of inflammation in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 91, Suppl 1, p. S19-S25, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0088>.

VERÍSSIMO, M. H. G. *et al.* Emprego da indução de periodontite experimental em camundongos para estudos clínicos: métodos e resultados. **Revista Brasileira De Pesquisa Em Saúde**, v. 23, n. 4, p. 98–104, 2022.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Geneva: World Health Organization; 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484> . Acessado em 01 dez 2022.

APÊNDICE A- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA E GRUPOS EXPERIMENTAIS

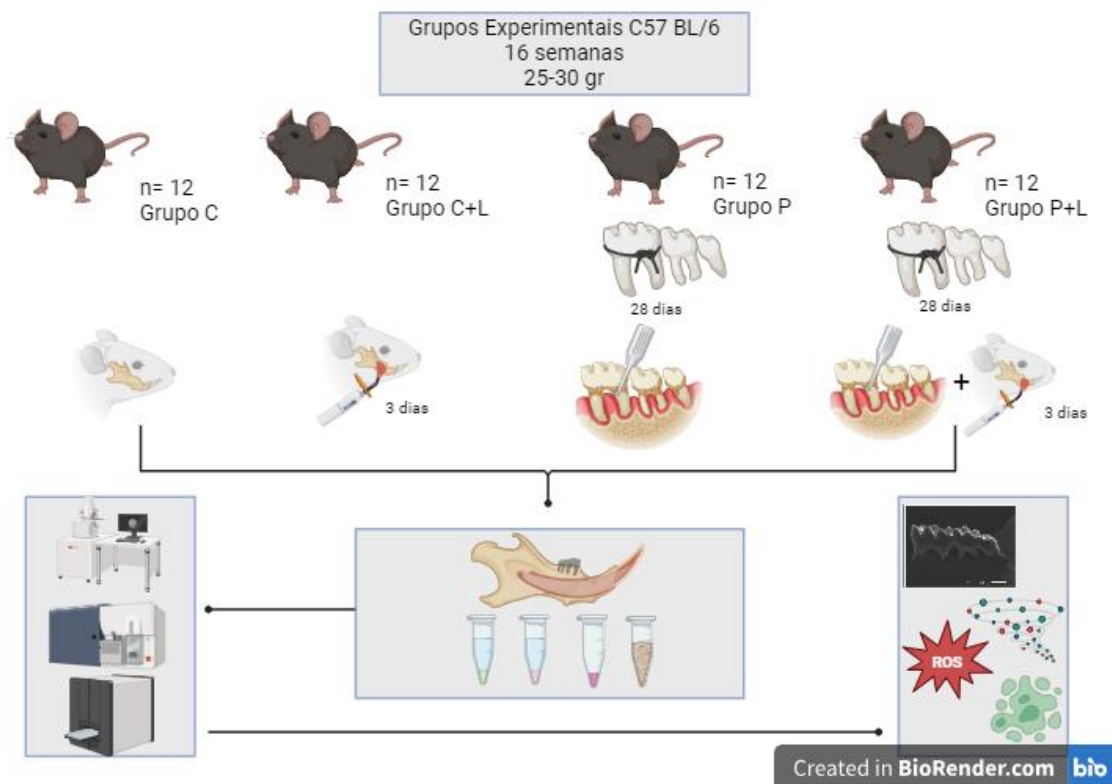


Figura 4. Desenho esquemático da metodologia aplicada por este estudo e apresentação dos grupos experimentais. Criado com Biorender.com.

APÊNDICE B- RESULTADOS E POSSÍVEIS MECANISMOS DE ATUAÇÃO DA LLLT

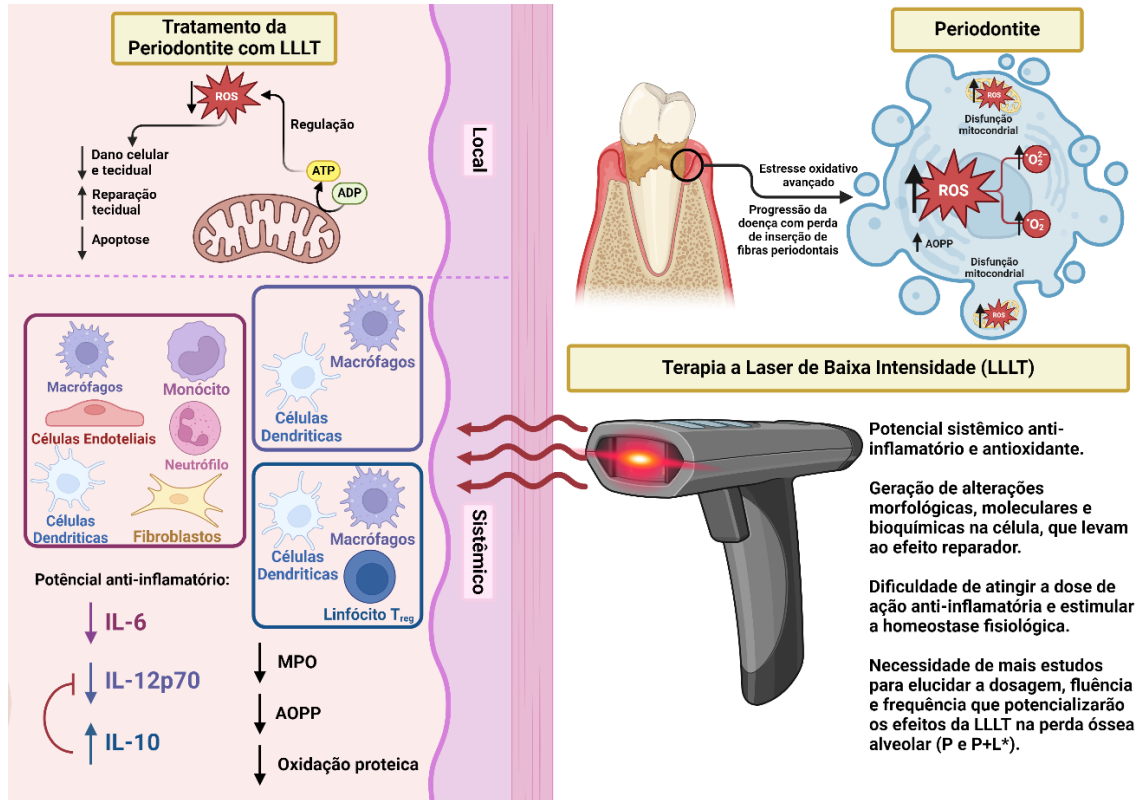


Figura 5. Resultados obtidos por esta pesquisa e possíveis mecanismos de atuação da LLLT

ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA-UFES)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LOCAL DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Registrada sob o n.º 27/2022

sob a responsabilidade de **SILVANA DOS SANTOS MEYRELLES**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exeto humano), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontro-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167.6.899, de 15 de julho de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia 01 de agosto de 2023 - ad referendum

Vigência da autorização: 08/2023

• 07/2027

Finalidade: Pesquisa

Espécie(s): Camundongo - Mus musculus

Linhagem(ões)/raça(s): C57/BL6

Sexo: Ambos

Peso: 20 a 30 gramas

Idade: 16 semanas

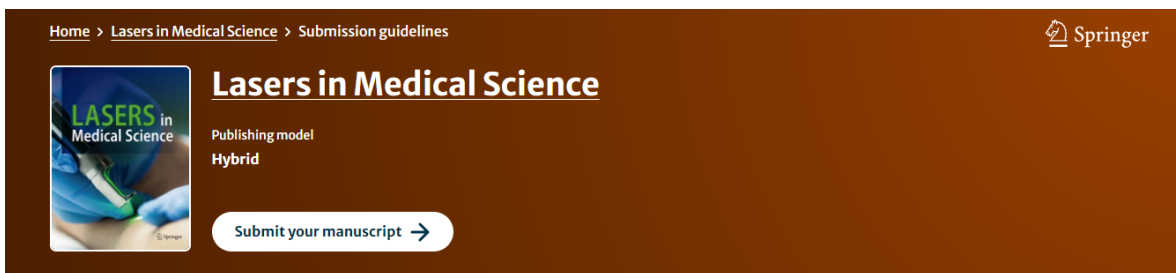
Número de animais: 44

Origem: Biotério Central da UFES-CCS.

Raquel Espíndola Dietzgen
 Raquel Espíndola Dietzgen
 Coordenadora da CEUA-UFES
 SUAPE 1134154

Vitória-ES, 01 de agosto de 2023

ANEXO B- NORMAS DA REVISTA LASERS IN MEDICAL SCIENCE



Home > Lasers in Medical Science > Submission guidelines

Lasers in Medical Science

Publishing model
Hybrid

Submit your manuscript →

Editorial board Aims and scope

Submission guidelines

For authors

Instructions for Authors

Types of papers

- Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures
- Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
- Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures - Case Reports will not be accepted!
- Letter to the Editor – up to 600 words

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

Editorial Procedure

Double-blind peer review

This journal follows a double-blind reviewing procedure. Authors are therefore requested to submit:

A blinded manuscript without any author names and affiliations in the text or on the title page. Self-identifying citations and references in the article text should be avoided.

A separate title page, containing title, all author names, affiliations, and the contact information of the corresponding author. Any acknowledgements, disclosures, or funding information should also be included on this page.

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit [ORCID](#) of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as [ChatGPT](#), do not currently satisfy our [authorship criteria](#). Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript.

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results

- Conclusion

For life science journals only (when applicable)

- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- Trial registration number and date of registration followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

- **Competing Interests:** Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to “Competing Interests and Funding” below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature’s LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Units and abbreviations

- Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].
- Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

Drugs

- When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].

3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org LTWA](http://ISSN.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file sn-basic.bst which is included in the [Springer Nature Article Template](#).

Tables

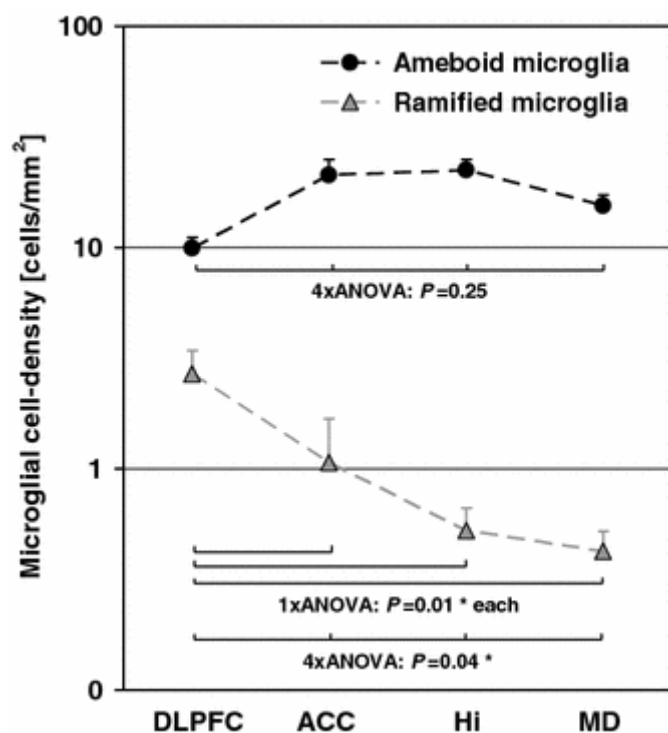
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

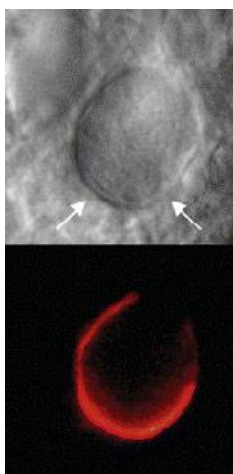
Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.

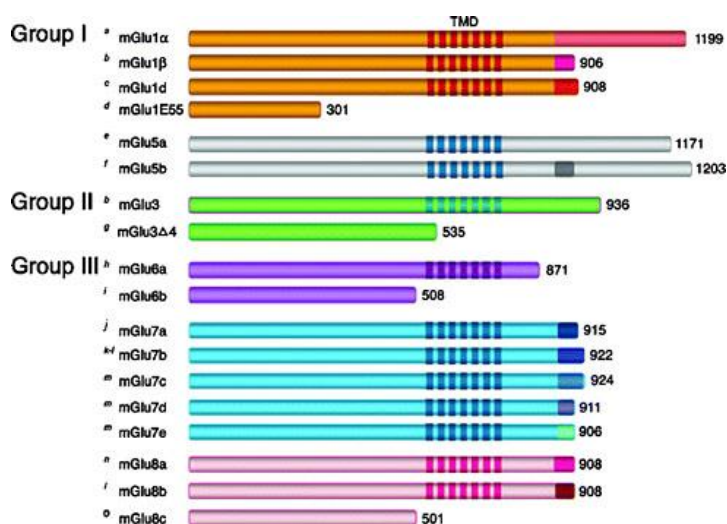
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s). Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Generative AI Images

Please check [Springer’s policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)) the journal will follow the [COPE](#) guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling (‘self-plagiarism’).
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. ‘salami-slicing/publishing’).

- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following [COPE](#) guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked “retracted” and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author’s institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author’s and article’s bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;

2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;

3) approved the version to be published; and

4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors.](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al., PNAS February 27, 2018](#)

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

[A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006](#)

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their [ORCID](#) ID when submitting an article for consideration or acquire an [ORCID](#) ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Competing Interests

Authors are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

Editorial Board Members and Editors are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list we recommend they declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

Funding: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

Employment: Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

Financial interests: Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

Non-financial interests: In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under ‘summary of requirements’ (see below) funding information should be included in the ‘**Declarations**’ section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a ‘Declarations’ section before the reference list under a heading of ‘Funding’ and/or ‘Competing interests’. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors’ contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- **Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company W and owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.

- **Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.

Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.

- **Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.

Non-financial interests: none.

- **Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.

Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Research involving human participants, their data or biological material

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the [1964 Declaration of Helsinki](#) and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on **Informed Consent**.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the [NCBI database](#) for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filip1^{tm1a(KOMP)Wtsi}* **RRID:MMRRC_055641-UCD**

Cell Line: RST307 cell line **RRID:CVCL_C321**

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, **RRID:AB_2722109**

Plasmid: mRuby3 plasmid **RRID:Addgene_104005**

Software: ImageJ Version 1.2.4 **RRID:SCR_003070**

RRIDs are provided by the [Resource Identification Portal](#). Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly [register a new resource](#) and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#).

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the [EQUATOR Network](#) when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials ([CONSORT](#)) and Study protocols ([SPIRIT](#))

Observational studies ([STROBE](#))

Systematic reviews and meta-analyses ([PRISMA](#)) and protocols ([Prisma-P](#))

Diagnostic/prognostic studies ([STARD](#)) and ([TRIPOD](#))

Case reports ([CARE](#))

Clinical practice guidelines ([AGREE](#)) and ([RIGHT](#))

Qualitative research ([SRQR](#)) and ([COREQ](#))

Animal pre-clinical studies ([ARRIVE](#))

Quality improvement studies ([SQUIRE](#))

Economic evaluations ([CHEERS](#))

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review

Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent/guardian if the participant is a minor or incapable or legal representative) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made aware what kind of (personal) data will

be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered “informed”. However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. A consent to publish form can be found

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a ‘Declarations’ section before the reference list under a heading of ‘Consent to participate’ and/or ‘Consent to publish’. Other declarations include Funding, Competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors’ contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Sample statements for "**Consent to participate**":

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

Sample statements for "**Consent to publish**":

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

Research Data Policy

This journal operates a [type 1 research data policy](#). The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

If the journal that you're submitting to uses double-blind peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also blinded. There are [data repositories that can assist with this](#) and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data repository, or help organising and sharing research data can access our [Author Support portal](#) for additional guidance.

After acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Shortly after this you will receive two e-mails. One contains a request to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article, as well as to arrange rights and payment of any associated publication cost. A second e-mail containing a link to your article's proofs will be sent once typesetting is completed.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.