

Adelino António Artur Abrantes

**INTEGRIDADE TECIDUAL, CUSTO E TEMPO ASSOCIADOS  
A DIFERENTES AGENTES DESMINERALIZADORES PARA  
ANÁLISE HISTOLÓGICA DO OSSO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia – Área de concentração em Diagnóstico Bucal  
Orientador: Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak  
Coorientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira.

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Abrantes, Adelino António Artur  
Integridade tecidual, custo e tempo associados a  
diferentes agentes desmineralizadores para análise  
histológica do osso / Adelino António Artur Abrantes ;  
orientador, Rogério de Oliveira Gondak ; coorientador,  
Filipe Modolo Siqueira. - Florianópolis, SC, 2015.  
66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós  
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Odontologia. 3. Patologia. 4.  
Desmineralização. I. Gondak, Rogério de Oliveira. II.  
Siqueira, Filipe Modolo. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.  
IV. Título.

Adelino António Artur Abrantes

**INTEGRIDADE TECIDUAL, CUSTO E TEMPO ASSOCIADOS  
A DIFERENTES AGENTES DESMINERALIZADORES PARA  
ANÁLISE HISTOLÓGICA DO OSSO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 04 de Dezembro de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Izabel Cristina Santos Almeida, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Rogério de Oliveira Gondak, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Filipe Modolo Siqueira, Dr.  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Fernanda Viviane Mariano, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade de Campinas

---

Prof.<sup>a</sup> Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Michelle Tillmann Biz, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esta conquista a *Deus*.

Ao dom e a graça da vida, pelas oportunidades que tem me oferecido.

A todos que contribuíram para a realização deste sonho, em especial:

À minha esposa *Margarida Rosa Livamba*, que com paciência compreendeu minha vivência a longa distância por vários anos, enquanto estava em busca dos meus sonhos e pelo amor, carinho e apoio em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus *Filhos*, pela paciência, compreensão e amizade;

Ao meu querido *Pai* e a minha querida *Sogra* em memória, que, pela vontade de Deus, não poderão partilhar comigo o final de mais uma etapa;

À minha querida *Mãe*, *Irmãos* e *Tios* pelo incondicional apoio e incentivo.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e aos meus queridos pais.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rogerio de Oliveira Gondak**, com quem o destino marcou o encontro. Sou-lhe grato, por ter assumido a orientação deste trabalho, pela paciência, disponibilidade e por ter dado incondicional apoio e presença nas distintas etapas deste trabalho, obrigado pelos conselhos, sugestões, contribuições para o meu crescimento intelectual neste período. Tu serás sempre uma referência para minha vida.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira**, por assumir a coorientação deste trabalho, pelo encorajamento e valiosas contribuições, ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Elena Riet-Correa Rivero**, pelos ensinamentos, dicas, disponibilidade, simplicidade e diretrizes dadas no encaminhamento do processo na sua fase inicial.

Aos meus colegas **Guilherme, Victor, Diogo, Jussara, Elisabeth e Emanuel**, obrigado pela amizade, pelos momentos divertidos, pelo carinho e apoio, jamais esquecerei esta etapa da minha vida e pelo privilégio de ter aprendido muito com cada um de vocês durante os dois anos.

A equipe de bolsistas e o funcionário do LPB **Tiago e Suzy**, sempre prontos a me auxiliarem no que fosse preciso, obrigado pela vossa dedicação.

A **Profa. Dr.<sup>a</sup> Liliane Janete Grando**, pelo apoio, firmeza, paciência, disponibilidade e comprometimento em formar o homem novo.

Ao **Prof. Dr. Filipe Daltoé**, pelo apoio e encorajamento.

A equipe de Professores do **Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina** e do **Ambulatório de Estomatologia** o meu muito obrigado pelos ensinamentos e dedicação.

Ao **Prof. Dr. Lucas António Nhamba**, pela assessoria e diretrizes dadas no encaminhamento do processo na sua fase inicial.

Ao **Dr. Abreu Pecamena Tondeso**, pelo apoio e valiosas contribuições ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Dr. Albino Ernesto Dumbi** e **Dr. Fernando Ferreira Vicente**, pelo apoio e encorajamento.

A **Sra. Adriana da Costa**, pelo convívio e apoio em toda fase da minha estadia em Florianópolis.

A **Sra. Victória Armando, Sra. Aguinolda Alves, Sra. Aldina da Silva Junior**, pelo apoio e amizade.

**A Direção Municipal de Saúde de Caála através do Hospital Municipal**, os meus agradecimentos pelo apoio, ensinamentos e encorajamento.

Ao **Governo Provincial do Huambo**, através do **Instituto Superior Politécnico do Huambo** e à **Administração Municipal da Caála e da Universidade José Eduardo dos Santos**, os meus agradecimentos pelo apoio, ensinamentos e oportunidade.

Tenha ânimo forte. Não desista. Persista. Imita a corrente da água que escoar sem cessar, apesar dos empecilhos da marcha. Sorria, apesar de tudo. Sorrindo, não há mágoa que possa subsistir no seu coração. Esforce-se. Recorde que a vitória, para ser verdadeira precisa ter sido difícil. Ame o mais que possa. Com amor, será mais fácil vencer as dificuldades. Lutar, continuar sempre, é saber desfrutar o verdadeiro valor da vida (Lourival Lopes).

De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar, e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda, um passo de dança, do medo, uma escada, do sonho, uma ponte e da procura, um encontro (Fernando Pessoa).

## RESUMO

A análise histopatológica do tecido ósseo ou mineralizado apenas é possível após a desmineralização tecidual que consiste em imergir as amostras em soluções ácidas ou quelantes. Este trabalho teve como objetivo testar diferentes procedimentos de desmineralização dos ossos, a fim de estabelecer o melhor valor destes em amostras fixadas em formalina e embebidos em parafina. Foram utilizados 130 discos de fêmur obtidos de 10 ratos Wistar machos adultos e distribuídos aleatoriamente em 5 grupos para desmineralização em soluções de ácido nítrico 5%, 10% e 20% (Grupo I), ácido fórmico 10%, 20% e 30% (Grupo II), ácido acético 10%, 20% e 30% (Grupo III), EDTA pH 7,4 a 5%, 10% e 20% (Grupo IV) e solução de Anna Morse (Grupo V). Cortes seriados de 3  $\mu$ m de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) para calcular a porcentagem de lacunas ocupadas por osteócitos. Os cortes histológicos também foram coradas com Tricrômio de Masson e Picrosirius sob polarização e uma análise semi-quantitativa foi aplicada para verificar a integridade do tecido muscular adjacente ao osso e a preservação das fibras colágenas. Foi calculado o tempo (dias) e o custo (dólares) para a realização da desmineralização completa para cada solução. O Grupo I exigiu menor tempo e custo financeiro (0,8 a 5,7 dias). A porcentagem mais elevada de lacunas ocupadas por osteócitos foi encontrada na desmineralização com a solução de ácido acético 10% (95,64%  $\pm$  0,95), seguido por ácido acético 30% (87,52  $\pm$  3,41%) e EDTA 5% (82,14%  $\pm$  4,02). Grupos III e IV necessitaram maior tempo para conclusão da desmineralização (48 a 79,8 dias). Entre todas as soluções, o ácido nítrico 5% apresentou menor custo em comparação com outras soluções ( $P < 0,001$ ), enquanto o ácido acético 30% teve maior custo para a conclusão da desmineralização. O Grupo IV teve a maior integridade muscular e do colágeno tipo I e II em relação aos demais grupos ( $P < 0,01$ ). Assim, concluímos que a desmineralização com ácido acético 10% foi o mais eficaz na preservação do tecido ósseo, enquanto o EDTA 5% foi o melhor na manutenção do colágeno e do músculo adjacente ao osso. Ácido nítrico 5% mostrou melhor equilíbrio entre tempo e o custo como solução desmineralizadora.

**Palavras-chave:** Desmineralização. Osso. Músculo. Colágeno.

## ABSTRACT

Histopathological analysis of bone and mineralized tissue is only possible after tissue demineralization consisting in immersing the samples in acid or chelating solutions. The aim of this study was to test different decalcification bone procedures in order to establish the best value of these in formalin-fixed and paraffin-embedded samples. Femurs were removed from ten adult male Wistar rats to obtain 130 bone disks randomly divided into 5 groups that were demineralized with nitric acid solutions at 5%, 10%, 20% (Group I), formic acid at 10%, 20% and 30% (Group II), acetic acid at 10%, 20% and 30% (Group III), EDTA pH 7.4 at 5%, 10% and 20% (Group IV) and Morse's solution (Group V). Serial 3- $\mu$ m-thick sections were obtained and stained with hematoxylin-eosin (H&E) to calculate the percentage of osteocytes-occupied lacunae. The sections were also stained with Masson's trichrome in conjunction with picosirius red under polarized light followed by a semi-quantitative analysis to verify the adjacent muscle to bone integrity and preservation of collagen fibers. It was measured the time in days for the complete demineralization for each solution and the financial cost in dollars was calculate for carrying out the solutions. Group I demanded the shortest time (0.8 to 5.7 days). The highest percentage of osteocytes-occupied lacunae was found with 10% acetic acid solution (95.64%  $\pm$  0.95) followed by 30% acetic acid (87.52%  $\pm$  3.41) and 5% EDTA (82.14%  $\pm$  4.02). Groups III and IV required more time for demineralization (48 to 79.8 days). Among all solutions, 5% nitric acid required less cost compared with other solutions ( $P < 0.001$ ) whereas 30% acetic acid required higher cost for the completion of demineralization. Group IV had the highest integrity for muscle and collagen type I and II ( $P < 0.01$ ). Thus, we concluded that demineralization with 10% acetic acid was the most effective in preserving the bone tissue while 5% EDTA was the best in maintaining the collagen and adjacent muscle to bone. Five percent nitric acid showed the most efficient result as it balances both time and cost as demineralizing solution.

**Keywords:** Demineralization. Bone. Muscle. Collagen.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de lacunas ocupadas por osteócitos, avaliação da integridade de colágeno e músculo adjacente ao osso, tempo e custos após a desmineralização em todos os grupos estudados.....	37
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto do osso cortical e tecido muscular após diferentes protocolos de desmineralização.....	39
Figura 2 - Avaliação do colágeno nas amostras de tecido ósseo pelas colorações histoquímicas Tricrômio de Masson e Picrosirius sob polarização.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
LPB	Laboratório de Patologia Bucal
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
PVPI	Polivinilpirrolidona
H&E	Hematoxilina & Eosina
pH	Potencial hidrogenico
DP	Desvio padrão
µm	Micrômetro
h	Horas
g	Gramas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
HCOOH	Ácido fórmico

## LISTA DE SÍMBOLOS

\$ Dólar

°C Graus Celsius

% Porcento



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
	<b>APÊNDICE A - Metodologia Expandida.....</b>	<b>49</b>
	<b>ANEXO A – Parecer Substanciado do CEUA.....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXO B – Guia de Informações ao Autor .....</b>	<b>55</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado composto por elementos minerais e orgânicos, organizado para desenvolver, dentre outros, a função de sustentação do corpo. O esqueleto é constituído para suportar mecanicamente o organismo, além de servir de apoio para as contrações dos músculos esqueléticos transformando-as em movimentos, proporcionando proteção aos órgãos moles. Os ossos são reservatórios de cálcio, fosfato e outros íons, essenciais na manutenção dos níveis plasmáticos desses elementos. Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem e são ativamente remodelados durante toda a vida, sendo a homeostase do tecido ósseo controlada pelos fatores mecânicos, locais e gerais (Katchburian & Arana-Chavez, 1999).

No tecido ósseo há células que constituem os principais agentes de modificação da matriz óssea, como o osteoblasto, produtor da matriz orgânica que posteriormente é mineralizada e o osteoclasto que, quando ativado, remove esta matriz (Martin, 1994).

A análise histopatológica de determinadas lesões em tecido mineralizado é possível após a desmineralização tecidual, que permite a remoção dos sais de cálcio e fosfato depositados sobre a matriz orgânica e a microtomia pelos métodos convencionais (Brown, 2007; Bancroft, 2008).

Um dos métodos mais comuns de desmineralização consiste em imergir as amostras em soluções ácidas ou quelantes. A escolha da solução desmineralizadora depende da urgência do caso, do grau de mineralização da amostra e das técnicas de coloração requeridas (Mattuella *et al*, 2007).

As substâncias ácidas mais empregadas como desmineralizadores são: o ácido nítrico, ácido fórmico, ácido clorídrico, ácido acético, ácido pícrico, ácido sulfúrico, tricloroacético ou sulfossalicílico em diferentes concentrações. Já o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é a substância quelante mais utilizada e atua capturando os íons de cálcio da camada externa do cristal de apatita (Kayhan & Algun, 2003; Reineke *et al*, 2006).

Os ácidos, como por exemplo, ácido nítrico e clorídrico, contém propriedades que promovem uma desmineralização rápida. Sua utilização por longo período pode levar a grave deterioração do conteúdo celular, especialmente da cromatina nuclear (Srinivasan *et al*, 2002). Para contornar tal problema, indica-se a utilização de agentes quelantes na desmineralização, como EDTA. A principal desvantagem é

que a desmineralização com EDTA ocorre lentamente, com um tempo de incubação de até várias semanas, dependendo do grau de mineralização tecidual (Kiviranta *et al.*, 1980; Stevens *et al.*, 1990).

Sanjai *et al.* (2012) avaliaram seis soluções desmineralizadoras (EDTA, ácido nítrico a 5%, ácido acético a 5%, ácido fórmico a 10%, solução de ácido nítrico-formaldeído e solução de Perenyi) para desmineralização de 24 dentes de pacientes com idades entre 40-45 anos. O EDTA foi considerado o melhor agente desmineralizador para preservação de tecidos duros e moles enquanto o ácido nítrico a 5% apresentou piores índices de degradação tecidual.

Para melhorar o tempo de desmineralização promovido pelo EDTA, alguns autores têm associado o uso do micro-ondas, com 270 W de potência, a 45°C durante 6h por dia, obtendo bons resultados, não só na redução do tempo em 50%, como também na conservação tecidual (Daisuke Ekuni *et al.*, 2006; Hellstrom & Nillson, 1992).

O ácido nítrico a 5%, apesar de muito utilizado devido ao reduzido tempo necessário para a desmineralização (Kayhan & Algun, 2003), não preserva a morfologia celular de forma apropriada (Yamamoto-Fukud *et al.*, 2000, Shibata *et al.*, 2000).

Anna Morse descreveu em (1945) um novo protocolo de desmineralização de tecidos mineralizados orais (dente e osso alveolar) utilizando a associação do ácido fórmico ao citrato de sódio (solução de Anna Morse). Após 10 anos de experimentação, 500 amostras teciduais desmineralizadas e 30.000 lâminas histológicas obtidas, o autor obteve melhores resultados quando comparado com o ácido nítrico que usualmente era empregado nas rotinas laboratoriais (Anna Morse, 1945).

Mattuella *et al.* (2007) obtiveram resultados mais favoráveis com a utilização da solução de Anna Morse para desmineralização de dentes decíduos humanos com lesão de cárie inativa quando comparados com a solução de EDTA, por requerer menor tempo de processamento das amostras e promover uma melhor preservação dos componentes celulares e da matriz extracelular do tecido pulpar.

Os ácidos provocam danos nos tecidos, principalmente no que diz respeito às suas afinidades tintoriais. Os seus efeitos negativos verificam-se especialmente na fraca basofilia nuclear, o que pode comprometer o correto diagnóstico. Quanto mais fortes forem as soluções ácidas e mais duradouro for o processo de desmineralização, mais acentuados serão os efeitos indesejáveis. A desmineralização já foi introduzida há alguns anos. Contudo, não existe um protocolo generalizado à rotina hospitalar ou laboratorial, e ainda menos no

contexto da Patologia. Através do aumento da temperatura é possível acelerar o processo, no entanto é necessário ter cuidados para que isso não comprometa a estrutura tecidual e consequentemente, a imagem microscópica (Giberson & Demaree, 2001; Duarte *et al*, 2012).

A preservação da integridade da estrutura tecidual após o processo de desmineralização é fundamental para a interpretação histopatológica. Embora haja uma grande variedade de agentes desmineralizadores, pouco tem sido explorado na literatura a respeito do uso de concentrações e metodologias adequadas para desmineralização efetiva de tecidos ósseos visando a manutenção da integridade tecidual e otimização do tempo para execução do processo. Diante disso, o presente estudo testou diversos protocolos de desmineralização, com fim de instituir aquele no qual seja possível desmineralizar peças ósseas em um menor tempo, com a máxima preservação dos tecidos, sem prejudicar a interpretação histopatológica.



## **2 JUSTIFICATIVA**

A escolha deste tema ocorreu inicialmente pela necessidade do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina em processar amostras de tecidos mineralizados em alta qualidade e menor período de tempo.

Embora haja na literatura diversos trabalhos que avaliem diferentes substâncias com efeitos de desmineralização em amostras de tecidos ósseos ou dentários, a literatura é escassa na avaliação da qualidade de tecido mole adjacente, bem como na avaliação dos custos financeiros e o tempo de desmineralização para a aplicação destas técnicas.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da preservação tecidual, custo e tempo de desmineralização de tecido ósseo submetido a diferentes protocolos: ácido nítrico 5%, 10% e 20%, ácido fórmico 10%, 20% e 30%, ácido acético 10%, 20% e 30%, soluções de EDTA 5%, 10% e 20%, e solução de Anna Morse.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar o custo e tempo de desmineralização do tecido ósseo submetido a diferentes concentrações de desmineralizadores (ácido nítrico, fórmico, acético e Anna Morse) e quelantes (EDTA);
- ✓ Avaliar o preenchimento de lacunas por osteócitos em tecido ósseo submetido a diferentes protocolos de desmineralização;
- ✓ Avaliar a preservação do colágeno e tecido muscular adjacente ao osso após desmineralização.



## 4 ARTIGO

Artigo formatado conforme nas normas da revista *Bone* (ANEXO A), com exceção do idioma e do formato das referências.

### Título

Integridade tecidual, custo e tempo associados ao uso de diferentes agentes desmineralizadores para análise histológica do osso.

### Resumo

Objetivo: testar diferentes procedimentos de desmineralização dos ossos, a fim de estabelecer o melhor valor destes em amostras fixadas em formalina e embebidos em parafina. Métodos: 130 discos de fêmur foram obtidos de 10 ratos Wistar machos adultos e distribuídos aleatoriamente em 5 grupos para desmineralização em soluções de ácido nítrico 5%, 10% e 20% (Grupo I), ácido fórmico 10%, 20% e 30% (Grupo II), ácido acético 10%, 20% e 30% (Grupo III), EDTA pH 7,4 a 5%, 10% e 20% (Grupo IV) e solução de Anna Morse (Grupo V). Cortes teciduais de 3  $\mu$ m de espessura foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) para calcular a porcentagem de lacunas ocupadas por osteócitos. Cortes adicionais também foram coradas com Tricrômio de Masson e Picrosirius sob polarização e uma análise semi-quantitativa foi aplicada para verificar a integridade do tecido muscular adjacente ao osso e a preservação das fibras colágenas. Resultados: A porcentagem mais elevada de lacunas ocupadas por osteócitos foi encontrada com a solução de ácido acético 10% ( $95,64\% \pm 0,95$ ), seguido por ácido acético 30% ( $87,52 \pm 3,41\%$ ) e EDTA 5% ( $82,14\% \pm 4,02$ ). Grupos III e IV necessitaram maior tempo para conclusão da desmineralização (48 a 79,8 dias) e o Grupo I exigiu menor tempo (0,8 a 5,7 dias). Entre todas as soluções, o ácido nítrico 5% apresentou menor custo em comparação com outras soluções ( $P < 0,001$ ), enquanto o ácido acético 30% teve maior custo para a conclusão da desmineralização. O Grupo IV teve a maior integridade muscular e do colágeno tipo I e II em relação aos demais grupos ( $P < 0,01$ ). Conclusão: A desmineralização com ácido acético 10% foi o mais eficaz na preservação do tecido ósseo, enquanto o EDTA 5% foi o melhor na manutenção do colágeno e do músculo adjacente ao osso. Ácido nítrico 5% apresentou melhor equilíbrio entre tempo e custo como solução desmineralizadora.

Palavras-chave: Desmineralização; Osso; Músculo; Colágeno.

### Introdução

O processo de desmineralização é comumente utilizado na maioria dos laboratórios de Patologia para o exame microscópico dos tecidos mineralizados (Ehrlich *et al.*, 2008, Farrell *et al.*, 2015). Este método remove os sais de cálcio dos tecidos mineralizados tornando-os mais adequados para os cortes histológicos (Page *et al.* 1996).

A desmineralização é realizada por soluções químicas, tais como ácidos minerais ou quelantes. Ácidos minerais possuem uma ação mais rápida enquanto os agentes quelantes oferecem uma maior preservação das estruturas histológicas (Leong 2009; Shibata *et al.* 2000). O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é frequentemente utilizado como agente quelante para desmineralização de tecido ósseo (Pitol, *et al.* 2007). Como ácidos minerais, têm sido relatados para desmineralização óssea o ácido nítrico (Neves *et al.* 2011), ácido acético (Yoshioka *et al.* 2002), ácido fórmico (Gupta *et al.* 2014) e Anna Morse (Morse, 1945) em diferentes concentrações.

Embora existam vários estudos que avaliem diferentes soluções com efeitos de desmineralização em amostras de tecido ósseo, a literatura é escassa em descrever como o tecido mole adjacente ao osso é afetado pelo processo de desmineralização, assim como os custos financeiros o tempo para a implementação destas técnicas.

### Material e métodos

Todos os procedimentos para este estudo foram aprovados pelo Comitê de Ético Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n.00940).

### Animais e Preparo tecidual

Dez ratos Wistar foram obtidos a partir do Centro de Criação Animal da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos à 21°C ± 1°C em um ciclo claro/escuro de 12 h de luz. Os ratos tiveram acesso ao alimento (ração padrão comercial, Nuvilab® CR-1; Nuvital, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Ratos apresentaram peso médio de 300 g e foram sacrificados por exposição a CO<sub>2</sub> com decapitação subsequente.

O fêmur de cada animal foi removido cirurgicamente e fixado em formalina tamponada a 10% durante 24 horas. Os espécimes foram seccionados com fresa de dupla face circular acoplada a motor cirúrgico (modelo Blm350, Driller, Brasil) sob irrigação com solução salina 0,9% para obtenção de 130 discos ósseos com volume de 3mm<sup>3</sup>. A conferência do tamanho dos discos de osso foi realizada com micrômetro de precisão (Mitutoyo, Tóquio, Japão). Cerca de 25% do

perímetro de cada disco ósseo foi preservado o tecido muscular adjacente.

#### Processamento de tecido e desmineralização

Os 130 discos ósseos foram distribuídos randomicamente em 5 grupos e desmineralizados a temperatura ambiente em soluções de ácido nítrico 5%, 10% e 20% (Grupo I), ácido fórmico 10%, 20% e 30% (Grupo II), ácido acético 10%, 20% e 30% (Grupo III), EDTA pH 7,4 a 5%, 10% e 20% (Grupo IV) e solução de Anna Morse (Grupo V).

As soluções de desmineralização foram submetidas à agitação repetida e substituídas por novas soluções a cada 24 horas e com volume suficiente para cobrir 20 vezes o volume de cada disco. A avaliação do processo de desmineralização foi realizada a cada 12 horas por método físico seguido por um método químico. O método físico envolveu agulhamento diário do osso cortical (agulha fina 30G, BD, Brasil) e o método químico foi o teste para detecção de cálcio na solução desmineralizadora (Farrell *et al.* 2015 ).

Após a desmineralização, os discos ósseos foram lavados em água destilada, em seguida desidratados em uma série de crescente de etanol, diafanizados com xilol, embebidos em parafina líquida e sólida. Secções seriadas de 3 µm de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (H & E), Tricrômio de Masson e Picrosirius.

#### Medição do tempo global e custo

Foi medido o tempo em dias para a conclusão da desmineralização de cada solução. O custo financeiro em dólares para a realização das soluções foi baseado no cálculo do reagente necessário para obtenção do volume necessário para cobrir 20 vezes o volume do tecido (Suvarna *et al.* 2013) e o volume total para substituição a cada 24 horas de cada solução até a completa desmineralização.

#### Análise microscópica

As lâminas histológicas foram fotografadas usando microscópio de luz (Axiostar, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) conectado à câmera (Cannon, A620, San Jose, CA, EUA) e analisadas com *software* ImageJ (1.45s Wayne Rasband Institutos Nacionais de Saúde, EUA ). Cortes corados com H&E foram examinados para calcular a porcentagem de lacunas ocupadas pelos osteócitos em sete campos sequenciados em aumento de 400x.

A análise semi-quantitativa foi aplicada para verificar a integridade do músculo adjacente ao osso e a preservação das fibras colágenas. Os cortes foram corados com Tricrômio de Masson em conjunto com Picosírius sob polarização (Junqueira *et al*, 1979). Os critérios utilizados para as avaliações foram: inaceitável (-), baixa integridade (+), integridade moderada (++) ou alta integridade (+++).

### Análise estatística

Os valores foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças no tempo, custo e percentual de lacunas ocupadas por osteócitos entre os grupos foram testadas usando ANOVA e teste de múltiplas comparações de Tukey *post hoc*. A integridade muscular e das fibras colágenas foram testadas usando o teste exato de Fisher. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. O software estatístico SPSS versão 18.0 foi utilizado para as análises.

### Resultados

#### Tempo e Custos Financeiros

Em relação ao tempo de desmineralização, as soluções dos Grupos III (ácido acético) e IV (EDTA) necessitaram mais tempo para completar o processo de desmineralização. Entre todas as soluções testadas, a desmineralização com ácido acético 10% requereu mais tempo para finalização (79,8 dias) enquanto a utilização de ácido nítrico 20% necessitou menor tempo (0,8 dias). Um tempo semelhante foi mostrado pelo ácido nítrico 5% e ácido nítrico 10% (5,7 dias). Foram encontradas diferenças significativas entre o desmineralizador mais rápido (ácido nítrico 20%) e outras soluções ( $P < 0,001$ ), bem como entre a solução mais lenta (ácido acético 10%) e outras soluções ( $P < 0,001$ ).

Os custos financeiros para a desmineralização estavam diretamente ligados à concentração das soluções e o tempo necessário para completar a preparação do espécime. Entre todas as soluções, ácido nítrico 5% exigiu um menor custo menor em comparação com outras soluções ( $P < 0,001$ ), enquanto o ácido acético 30% exigiu o maior custo para a conclusão da desmineralização.

Dados adicionais são apresentados na **Tabela 1**.

#### Lacunas ocupadas por osteócitos

Grupos III (ácido acético) e IV (EDTA) tiveram uma maior porcentagem de lacunas ocupadas por osteócitos em comparação com os outros grupos (**Tabela 1**).

O maior percentual de lacunas ocupadas pelos osteócitos foi encontrado com o ácido acético 10% ( $95,64\% \pm 0,95$ ), seguido por ácido acético 30% ( $87,52\% \pm 3,41$ ) e EDTA 5% ( $82,14\% \pm 4,02$ ) (**Figura 1**). A pior porcentagem de preservação de osteócitos foi observada com o ácido nítrico 20% ( $8,33 \pm 8,78\%$ ). Houve diferença estatística entre as soluções de ácido acético 10% e as demais soluções ( $P < 0,001$ ), exceto para o ácido acético 30% ( $P = 0,057$ ).

### Músculo e colágeno

Alta integridade do músculo adjacente ao osso após a desmineralização foi observada apenas com ácido nítrico a 5% e EDTA a 5%. O tecido muscular foi considerado inaceitável de acordo com os critérios de avaliação para todas as concentrações de ácido acético (10%, 20% e 30%), ácido nítrico 20% e ácido fórmico 30% (**Figura 1**).

O melhor resultado em termos de integridade do colágeno, incluindo o tipo I e III, foi observado com o Grupo IV (EDTA). Os piores resultados foram encontrados nos Grupos II (ácido fórmico) e III (ácido acético) (**Figura 2**). Houve diferença estatística entre todos os grupos em relação à integridade muscular e das fibras colágenas ( $P < 0,01$ ).

### Discussão

Vários espécimes de tecido ósseos obtidos a partir de procedimentos cirúrgicos orais e ortopédicos são investigados para fins de diagnóstico. A seleção de uma solução adequada para a desmineralização em laboratórios de Patologia depende de vários fatores, tais como a preservação da celularidade, urgência na liberação de laudos anatomopatológicos, integridade do tecido mole adjacente ao osso e custos financeiros. Tanto quanto é do conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo que comparou a interferência de um grande número de soluções quelantes e ácidas em tecidos ósseo e muscular, além da análise do tempo e custos envolvidos no processo.

As soluções ácidas removem o carbonato de cálcio ou sais de fosfato presente nos ossos, realizando uma troca iônica que resulta na formação de um polímero solúvel de sal de cálcio. Há um grande número de agentes ácidos, incluindo ácidos fracos ou fortes, que podem ser aquosos ou alcoólicos. A utilização de soluções ácidas pode danificar a ultraestrutura do tecido mole principalmente quando a

desmineralização requer longo tempo ou a solução é utilizada em altas concentrações (Callis & Sterchi 1998, Leong, 2009).

Ácidos fortes têm maior poder de desmineralização, causando danos aos tecidos, particularmente para os núcleos que são hidrolisados dificultando o uso subsequente de colorações nucleares. Este tipo de solução é comumente usado para o diagnóstico em caráter urgencial em rotinas laboratoriais. Para condições não urgentes, são aconselhados agentes quelantes (Suvarna *et al.* 2013).

Ácidos fracos comumente utilizados como desmineralizadores são o ácido acético, ácido fórmico e ácido pícrico. O ácido acético e o ácido pícrico também são amplamente utilizados como fixadores teciduais e para desmineralização de tecidos ligeiramente mineralizados como o tecido embrionário (Skinner *et al.* 1997). No presente trabalho, o ácido acético 10% teve a maior porcentagem de ocupação de lacunas por osteócitos do que o ácido fórmico em todas as concentrações. Entretanto, o ácido fórmico necessitou de menor tempo para desmineralização do que o ácido acético.

Ácido nítrico 5% e solução de Anna Morse apresentam bons resultados para uma desmineralização em curto período de tempo (Shibata *et al.* 2000), como observado em nossa pesquisa. Estas soluções são bem indicadas em laboratório de rotina, quando a seleção de um agente desmineralizador deve equilibrar o tempo para desmineralização e a integridade tecidual.

Agentes quelantes como o EDTA são compostos orgânicos que se ligam aos íons cálcio formando quelatos. Este método é muito lento, porém não causa danos aos tecidos (Callis *et al.*, 2008). A desmineralização pelo EDTA 5%, 10% e 20% não produziram artefatos para as colorações histológicas, ao contrário da desmineralização pelo ácido nítrico 20% que gerou artefatos para as colorações em H&E e histoquímicas.

O EDTA é comumente usado como agente de desmineralização cuja ação quelante promove a desmineralização e preserva a morfologia do tecido ósseo (Frank *et al.* 1993; Emans *et al.* 2005; Pitol *et al.* 2007). A eficácia da solução de EDTA na desmineralização é influenciada pela concentração do pH e o tempo de exposição (Cury *et al.* 1981; O'Connell *et al.* 2000; Serper & Calt, 2002). Os valores de pH elevados, o número de grupos hidroxilas em excesso retardam a dissociação da hidroxiapatita, ao passo que o pH neutro ou baixo, a ligação de íons cálcio tendem a aumentar a dissociação de hidroxiapatita e a sua disponibilidade para a quelação (O'Connell *et al.* 2000).

No presente estudo, o EDTA, em todas as concentrações, teve alta porcentagem de lacunas ocupadas pelos osteócitos e preservação do colágeno tipo I e III. No entanto, o EDTA a 5% preservou melhor o músculo adjacente ao osso do que o EDTA a 10% ou 20%. Interessantemente, não houve relação entre o tempo de desmineralização e a preservação muscular com as soluções quelantes.

Gupta *et al.* (2014) compararam a eficácia de vários agentes de desmineralização incluindo o ácido nítrico 10%, ácido fórmico 10% e EDTA na avaliação histológica dos componentes do tecido duro e mole de elementos dentais. O resultado mais eficiente em relação ao fator de integridade tecidual e o tempo foram obtidos com o ácido nítrico a 10%. No corrente estudo, o ácido nítrico 10% e ácido fórmico 10% tiveram resultados semelhantes em ambos os tecidos duros e moles. No entanto, o EDTA foi melhor do que os referidos ácidos na preservação dos tecidos.

Mattuella *et al.* (2007) investigaram a eficácia do EDTA e a solução de Anna Morse para processamento de dentes decíduos humanos com lesões de cárie. Os autores descobriram que o EDTA causou alterações na arquitetura celular e tecidual devido ao seu longo período de tempo necessário para a desmineralização. No nosso estudo, o EDTA levou muito tempo para completar o processo de desmineralização o que não interferiu na preservação do tecido. No entanto, a diminuição da integridade do tecido foi associada com o aumento da concentração.

Zappa *et al.* (2005) analisaram diferentes métodos para desmineralização de 288 dentes fixados em solução de formalina 10% . Ácido nítrico 7% e solução de ácido fórmico (HCOOH) com 70% de álcool etílico na proporção 1: 1 apresentaram piores resultados após a desmineralização para componentes dos tecidos duros e moles do dente quando em comparação com EDTA e outros agentes. Além disso, outros estudos (Singh S, K Sarkar, 2010; Sanjai K *et al.* 2012) também revelaram os melhores resultados utilizando EDTA. Por outro lado, Gupta *et al.* (2014) mostraram melhor preservação dos tecidos e qualidade da coloração com ácido nítrico a 10% do que o ácido fórmico 10% ou EDTA.

Em relação aos custos para desmineralização, a literatura é escassa sobre este aspecto. Os nossos resultados mostraram que os custos estiveram diretamente relacionados com a concentração das soluções e o tempo necessário para completar a preparação da amostra. Ácido nítrico 5% teve o menor custo e apresentou uma boa relação

entre o custo e preservação tecidual, tendo boa indicação para uso em laboratórios de Patologia.

Algumas soluções removem os íons cálcio rápida e completamente, mas podem danificar a contraparte orgânica (Sanjai *et al.* 2012). Além disso, o tamanho da amostra de osso é um fator importante no processo de desmineralização (González-Chávez, 2013). De acordo com o tamanho da amostra, o volume da solução de desmineralização deve ser calculado para uma maior eficácia do processo e para a diminuição do tempo.

Para a determinação do ponto final da desmineralização óssea, vários métodos têm sido sugeridos, tais como os métodos físicos, químicos ou radiográficos (González-Chávez *et al.* 2013; Farrell *et al.* 2015). Teste físico foi feito no atual estudo usando a inserção de agulha no osso cortical. Uma vez que não é considerado como um método preciso, foi utilizado o método químico (teste de oxalato de cálcio) no corrente estudo o qual facilmente pode ser instituído como teste de rotina em laboratórios histopatológicos.

Métodos alternativos como micro-ondas (Pitol *et al.* 2007; Cunningham *et al.* 2001) e irradiação por ultrassom (Hatta *et al.* 2014) têm sido propostos a fim de acelerar e melhorar a desmineralização. No entanto, as desvantagens destes métodos incluem o aumento da temperatura que poderia danificar o espécime, custo elevado e difícil reprodutibilidade em laboratórios de diagnóstico.

Nossos achados mostraram que a desmineralização com ácido acético 10% foi o mais eficaz na preservação do tecido ósseo, enquanto o EDTA 5% foi o melhor na manutenção do colágeno e do músculo adjacente ao osso. Além disso, o ácido nítrico 5% apresentou melhor equilíbrio entre tempo e custo como solução desmineralizadora.

Assim, embora a velocidade da desmineralização seja um critério importante para a desmineralização, outros fatores como a integridade do tecido, tempo e custo devem ser considerados para a investigação histológica.

## Referências

Callis G, Sterchi D. Decalcification of bone: literature review and practical study of various decalcifying agents, methods, and their effects on bone histology. *J Histotechnol* 1998; 21:49-58.

Cunningham CD, Schulte BA, Bianchi LM, Weber PC, Schmiedt BN. Microwave decalcification of human temporal bones. *Laryngoscope* 2001; 111: 278-82.

Cury JA, Bragotto C, Valdrighi L. The demineralizing efficiency of EDTA solutions on dentin. Part I: influence of pH. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 52:446-8.

Ehrlich H, Koutsoukos P, Demadis K, Pokrovsky OS Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks-Part I Common definitions and history. *Micron* 2008; 39:1062-91.

Emans PJ, Bulstra SK and Kuijjer R. The effects of different decalcification protocols on TUNEL and general cartilage staining. *Biotech Histochem* 2005; 80: 111-5.

Farrell SF, Osmotherly PG, Rivett DA, Cornwall J. Formic acid demineralization does not affect the morphometry of cervical zygapophyseal joint meniscoids. *Anat Sci Int* 2015; 90:57–63

Frank JD, Balena R, Masarachia P, Seedor JG and Cartwright ME. The effects of three different demineralization agents on osteopontin localization in adult rat bone using immunohistochemistry. *Histochemistry* 1993; 99: 295-301.

Gupta S, Jawanda MK, Sm M, Barthi A. Qualitative histological evaluation of hard and soft tissue components of human permanentteeth using various decalcifying agents – a comparative study. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8:69-72.

González-Chávez SA, Pacheco-Tena C, Macías-Vázquez CE, Luévano-Flores E. Assessment of different decalcifying protocols on Osteopontin and Osteocalcin immunostaining in whole bone specimens of arthritis rat model by confocal immunofluorescen. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6:1972-83.

Hatta H, Tsuneyama K, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, et al. Simple and rapid decalcification procedure of skeletal tissues for pathology using an ultrasonic cleaner with D-mannitol and formic acid. *Acta Histochemica*, 2014; 116: 753-7.

Junqueira LCU, Bignolas G, Bretani RR Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11: 447-55.

Leong A. *Microwave applications in pathology*. New York: Nova Science Publishers, 2009.

Mattuella LG, Bento LW, Vier – Pellisser FV, Araiyo FB, Fossati AC. Comparative analysis of two fixing and two decalcifying solutions for processing of human primary teeth with inactive carious lesion. *Rev odontocienc.* 2007; 22:99-105.

Morse A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin., Department of oral Pathology, Tufle College dental School, Boston, Mass., March, 1945.

Neves Jdos S, Omar NF, Narvaes EA, Gomes JR and Novaes PD. Influence of different decalcifying agents on EGF and EGFR immunostaining. *Acta Histochem* 2011; 113: 484-8.

O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *J Endodon* 2000; 26:739-43.

Page K, Stevens A, Lowe J, Bancroft JD. Bone. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1996; 309-39.

Pitol DL, Caetano FH and Lunardi LO. Microwave-induced fast decalcification of rat bone for electron microscopic analysis: an ultrastructural and cytochemical study. *Braz Dent J* 2007; 18: 153-7.

Sanjai K, Kumarswamy J, Patil A, Papaiah L, Jayaram S and Krishnan L. Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012; 16: 222-7.

Serper A, Çalt S. The Demineralizing Effects of EDTA at Different Concentrations and pH. *J Endodon* 2002; 28:501-2.

Shibata Y, Fujita S, Takahashi H, Yamaguchi A and Koji T. Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive in situ hybridization in calcified tissues. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 153-9.

Singh S, Sarkar K. Evaluation of efficacy of various chemicals for decalcification of dental hard tissues- an in- vitro study. *J Orofac Sci.* 2010; 1:5-10.

Skinner RA, Hickmon SG, Lumpkin CK, Aronson J, Nicholas RW. Decalcified Bone: Twenty Years of Successful Specimen Management. *The Journal of Histotechnology* 1997; 20; 267-77.

Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th ed. London: Churchill Livingstone; 2013; 324-7.

Yoshioka M, Yoshida Y, Inoue S, Lambrechts P, Vanherle G, Nomura Y, Okazaki M, Shintani H, Van Meerbeek B. Adhesion/decalcification mechanisms of acid interactions with human hard tissues. *J Biomed Mater Res.* 2002; 59: 56-62.

Zappa J, Cieslik-Bielecka A, Adwent M, Cieslik T, Sabat D. Comparison of different decalcification methods to hard teeth tissues morphological analysis. *Dent Med Probl.* 2005; 42:21-26.



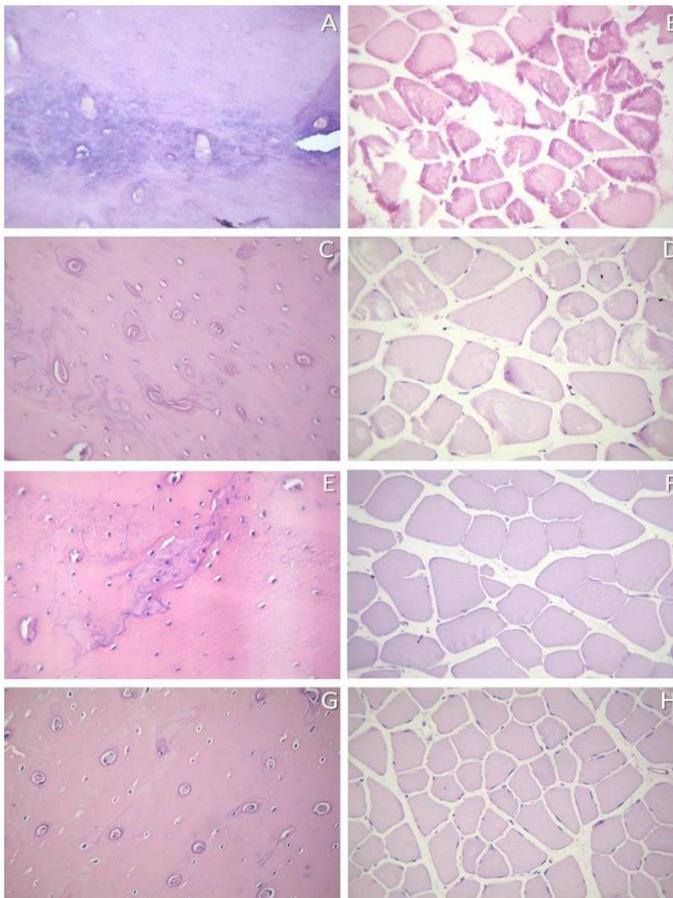
**Tabela 1.** Tempo, custo, porcentagem de lacunas ocupadas pelos osteócitos (%  $\pm$  desvio padrão) e avaliação da preservação do colágeno e músculo adjacente ao osso após a desmineralização em todos os grupos estudados.

Grupos	Tempo (dias)	Custo (dólar)	Lacunas ocupadas pelos osteócitos	Colágeno*	Músculo*
Ácido nítrico 5% (n=10)	5,7	1,52	53,87 $\pm$ 7,59	++	+++
Ácido nítrico 10% (n=10)	5,7	3,04	60,03 $\pm$ 2,59	+	++
Ácido nítrico 20% (n=10)	0,8	4,16	8,33 $\pm$ 8,78	-	-
Ácido fórmico 10% (n=10)	40,8	16,25	77,48 $\pm$ 0,86	+	++
Ácido fórmico 20% (n=10)	40,8	25	64,13 $\pm$ 1,72	-	+
Ácido fórmico 30% (n=10)	19,7	30	53,09 $\pm$ 8,90	-	-
Ácido acético 10% (n=10)	79,8	18,46	95,64 $\pm$ 0,95	-	-
Ácido acético 20% (n=10)	53,7	30,78	64,89 $\pm$ 0,11	-	-
Ácido acético 30% (n=10)	48	40,01	87,52 $\pm$ 3,41	-	-
EDTA 5% (n=10)	67,7	3,37	82,14 $\pm$ 4,02	+++	+++
EDTA 10% (n=10)	57,7	5,99	79,88 $\pm$ 5,14	+++	++
EDTA 20% (n=10)	53,7	11,23	63,31 $\pm$ 6,30	+++	+
Anna Morse (n=10)	6,8	10,12	76,83 $\pm$ 6,03	++	++

\*Sistema de escore: inaceitável (-), baixa integridade (+), integridade moderada (++) ou alta integridade (+++).

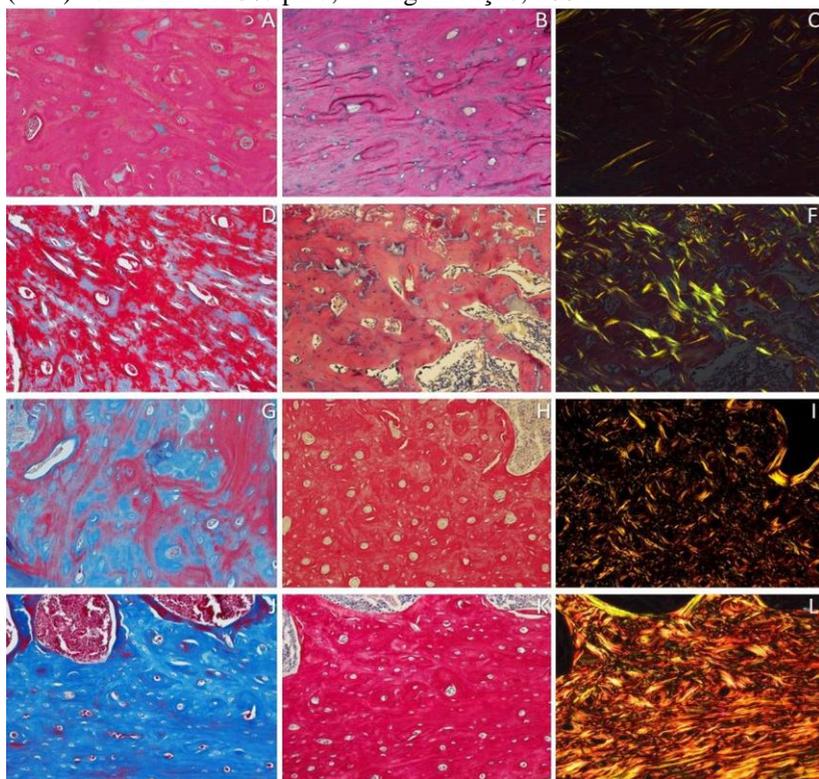


**Figura 1.** Aspecto do osso cortical e tecido muscular após diferentes protocolos de desmineralização. **A**, Comprometimento da preservação do tecido ósseo com o ácido nítrico 20%. **B**, Inaceitável integridade muscular (-) com a solução de ácido fórmico 30%. **C**, Aspecto do osso cortical com a solução de Morse. **D**, Pobre integridade muscular (+) com o EDTA 20% pH 7,4. **E**, Tecido ósseo com o ácido acético 10%. **F**, Moderada integridade muscular (++) com o ácido fórmico 10%. **G-H** Alto índice de ocupação das lacunas por osteócitos e preservação muscular (+++), respectivamente, com o EDTA 5% pH 7,4. Magnificação, 400x.





**Figura 2.** Identificação do colágeno marcado em azul pela coloração histoquímica Tricrômio de Masson no tecido ósseo submetido à desmineralização com ácido nítrico 20% (A), ácido fórmico 10% (D), solução de Anna Morse (G) e EDTA 5% pH 7,4 (J). Colágeno marcado em vermelho pela coloração histoquímica Picosirius (B,E,H,K) e sob polarização destacando as fibras colágenas do tipo I (amarelo) e do tipo III (verde) (C,F,I,L). B,C Inaceitável preservação do colágeno (-) com ácido nítrico 20%. E,F, Pobre densidade de colágeno (+) com o ácido fórmico 10% H,I Moderada integridade de fibras colágenas (++) com a solução de Anna Morse. K,L Alta densidade de colágeno tipo I e III (+++) com o EDTA 5% ph 7,4. Magnificação, 400x.





## REFERÊNCIAS

- BANCROFT, J. **Theory and Practice of Histological Techniques**. London: Churchill Livingstone, Elsevier, 6<sup>th</sup> edition, 2008.
- BROWN, M; REED, R; HENRY, R. Effects of dehydration mediums and temperature on total dehydration time and tissue shrinkage. **J Int Soc Plastination**, v.17, p.28–33, 2007. Disponível em: <[http://plastination.org/journal/archive/jp\\_vol.17/jp\\_vol.17\\_28-33.pdf](http://plastination.org/journal/archive/jp_vol.17/jp_vol.17_28-33.pdf)>.
- CALLIS, G; STERCHI D. Decalcification of bone: literature review and practical study of various decalcifying agents, methods, and their effects on bone histology. **J Histotechnol**, v.21, p.49-58, 1998. Disponível em: <<http://www.maneyonline.com/doi/abs/10.1179/his.1998.21.1.49>>.
- CUNNINGHAM, D., *et al.* Microwave decalcification of human temporal bones. **Laryngoscope**, v.111, p.278-360, 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1097/00005537-200102000-00017/pdf>>.
- CURY, J.A.; BRAGOTTO C.; VALDRIGHI, L. The demineralizing efficiency of EDTA solutions on dentin. Part I: influence of pH. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.52, p.446–454, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6795559>>.
- DAISUKE, E. *et al.* RNA integrity and in situ RT-PCR in dento-alveolar tissues after microwave accelerated demineralization. **Arch Oral Biol**, v.51, p.164—169, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098949>>.
- DUARTE, A.; DIREITO, I.; LADEIRA, C. Descalcificação em Microondas com Ácido Nítrico a 5% e RDO, **Micron**, n. 16, p.16-21, 2012. Disponível em: < <http://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/3788> >.
- EHRlich, H. *et al.* OS Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks-Part I Common definitions and history. **Micron**, v.39, p.1062-1091, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804381>>.

EMANS, P.J.; BULSTRA, S.K.; KUIJER, R. The effects of different decalcification protocols on TUNEL and general cartilage staining. **Biotech Histochem**, v.80, p.111-116, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298895>>.

FARRELL, S. F. *et al.* Formic acid demineralization does not affect the morphometry of cervical zygapophyseal joint meniscoids. **Anat Sci Int**, v.90, p.57-63, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12565-014-0248-8>>.

FRANK, J.D. *et al.* The effects of three different demineralization agents on osteopontin localization in adult rat bone using immunohistochemistry. **Histochemistry**, v.99, p.295-301, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8500993>>.

GIBERSON, R.T.; DEMAREE, Jr. R.S. **Microwave Techniques and Protocols**. New Jersey: Humana Press Inc., 2001.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, S.A. *et al.* Assessment of different decalcifying protocols on Osteopontin and Osteocalcin immunostaining in whole bone specimens of arthritis rat model by confocal immunofluorescen. **Int J Clin Exp Pathol**, v.6, n.10, 1972-1983, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24133575>>.

GUPTA, S. *et al.* Qualitative histological evaluation of hard and soft tissue components of human permanent teeth using various decalcifying agents a comparative study. **Clin Diagn Res J**, v.8, p.69-72, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4225979/pdf/jcdr-8-ZC69.pdf>>.

HELLSTROM, S.; NILSSON, M. The microwave oven in temporal bone research. **Acta Otolaryngol Suppl**, v.494, p.15-18, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1636416>>.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRETANI, R.R. Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **J Histochem**, v.11, p.447 – 455, 1979. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fbf01002772>>.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVEZ, V.E. **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Medicina Panamericana, 1999.

KAYHAN, F.T.; ALGUN, Z. A histologic study on the temporal bone of guinea pigs. **Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg**, v. 10, n. 2, p. 51-58, 2003. Disponível em:  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=12717057\[juid\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=12717057[juid])>.

KIVIRANTA, M.; TAMMI, R.; LAPPALAINEN, T. The rate of calcium extraction during EDTA decalcification from thin bone slices as assessed with atomic absorption spectrophotometry. **Histochemistry**, v. 68, n. 2, p. 119-127, 1980. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6774956>>.

LEONG, A. **Microwave applications in pathology**. New York: Nova Science Publishers, p. 162, 2009.

MARTIN, T.J. Ng. K.W. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. **J Cell Biochem**, v.56, n.3, p. 357-423, 1994 Nov. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876329>>.

MATTUELLA, L.G. *et al.* Comparative analysis of two fixing and two decalcifying solutions for processing of human primary teeth with inactive carious lesion. **Rev Odontocienc**, v.22, n.56, p.99-105, 2007. Disponível em:  
<<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/article/viewFile/1259/984>>.

MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **J Dent Res**, v.24, p. 143-153. Disponível em:  
<<http://jdr.sagepub.com/content/24/3/143.extrac>>.

NEVES, J. S. *et al.* Influence of different decalcifying agents on EGF and EGFR immunostaining. **Acta Histochem**, v.113, p.484-492, 2011. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128110000504>>.

O'CONNELL, M.S. *et al.* A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. **J Endodon**, v.26,p.739-7782, 2000.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239905608357>

>.

PAGE, K. *et al.* **Theory and practice of histological techniques**. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, p.309-348, 1996.

PITOL, D.L.; CAETANO, F.H.; LUNARDI, L.O. Microwave-induced fast decalcification of rat bone for electron microscopic analysis: an ultrastructural and cytochemical study. **Braz Dent J**, v.18, p.153-160, 2007.

REINEKE, T. *et al.* Ultrasonic decalcification offers new perspectives for rapid FISH, DNA, and RT-PCR analysis in bone marrow trephines. **Am J Surg Pathol**, v. 30, n. 7, p. 892-898, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819333>>.

SANJAI, K. *et al.* Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. **J Oral Maxillofac. Pathol.** v.16. p.222-249, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3424938/>>.

SERPER, A.; ÇALT, S. The Demineralizing Effects of EDTA at Different Concentrations and pH. **J Endodon**, v.28, p.501-503, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239905605262>>.

SHIBATA, Y. *et al.* Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive in situ hybridization in calcified tissues. **Histochem Cell Biol**, v.113, p.153-162, 2000. Disponível em: <[http://genedetect.com/Merchant2/ExampleRefs/Decalcifying\\_protocols.pdf](http://genedetect.com/Merchant2/ExampleRefs/Decalcifying_protocols.pdf)>.

SINGH, S.; SARKAR, K. Evaluation of efficacy of various chemicals for decalcification of dental hard tissues- an in- vitro study. **J Orofac Sci.**, v.1, p.5-10, 2010.

SKINNER, R.A. *et al.* Decalcified Bone: Twenty Years of Successful Specimen Management. **J Histotechnol**, v.20, p.267-277, 1997. Disponível em: <<http://www.maneyonline.com/doi/abs/10.1179/his.1997.20.3.267>>.

SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D.; JEWELL, S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. **Am J Pathol**, v. 161, n. 6, 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466110>>.

STEVENS, A.; LOWE, J.; BANCROFT, J.D. **Theory and practice of Histological Techniques**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 3<sup>rd</sup> edition, p. 309-341, 1990.

SUVARNA, S.K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J.D. **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**. 7th ed. London: Churchill Livingstone, p.324-331, 2013.

YAMAMOTO-FUKUD, T. *et al.* Effects of various decalcification protocols on detection of DNA strand breaks by terminal dUTP nick end labelling. **Histochem J**, v.32, 697-702, 2000. Disponível em:

<<http://scicurve.com/paper/11272810>>.

YOSHIOKA, M. *et al.* Adhesion/decalcification mechanisms of acid interactions with human hard tissues. **J Biomed Mater Res**, v.59, n.1, p.56-62, 2002. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.1216/epdf>>.

ZAPPA, J. *et al.* Comparison of different decalcification methods to hard teeth tissues morphological analysis. **Dent Med Probl**, v.42, p.21-26, 2005. Disponível em: <

[http://www.dmp.umed.wroc.pl/artykuly/DMP\\_2005421021.pdf](http://www.dmp.umed.wroc.pl/artykuly/DMP_2005421021.pdf)>.



## APÊNDICE A - METODOLOGIA EXPANDIDA

### *Aspectos éticos*

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), com o protocolo PP000940 (ANEXO A).

### *Delineamento do estudo*

Estudo observacional descritivo e retrospectivo.

### *Amostra*

Dez ratos Wistar machos adultos (120 dias) foram obtidos a partir do Centro de Criação Animal da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos à  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  em um ciclo claro/escuro de 12 h de luz. Os ratos tiveram acesso ao alimento (ração padrão comercial, Nuvilab® CR-1; Nuvital, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Ratos apresentaram peso médio de 300 g e foram sacrificados por exposição a  $\text{CO}_2$  com decapitação subsequente.

### *Procedimentos operatórios*

Os procedimentos operatórios foram realizados utilizando instrumental esterilizado em autoclave por calor úmido e os pesquisadores utilizaram equipamentos de proteção individual (EPIs). Os animais foram tricotomizados nas regiões das duas coxas traseiras e posicionados em decúbito dorsal. Na sequência, foi realizada a antisepsia das áreas que foram operados com polivinilpirrolidona (PVPI) e colocados em campos cirúrgicos esterilizados. Para o acesso às regiões femorais dos animais, foi utilizado cabo de bisturi n°3 conectado a lâmina de bisturi n°15.

O fêmur de cada animal foi removido cirurgicamente e fixado em formalina tamponada a 10% durante 24 horas. Os espécimes foram seccionados com fresa de dupla face circular (22mm, Dhpro) acoplada a motor cirúrgico (modelo Blm350, Driller, Brasil) sob irrigação com solução salina 0,9% para obtenção de 130 discos ósseos com volume de  $3\text{mm}^3$ . A conferência do tamanho dos discos de osso foi realizada com micrômetro de precisão (Mitutoyo, Tóquio, Japão). Todos os discos tiveram cerca de 25% do seu perímetro coberto por tecido muscular.

Diante da amostra disponível, obtivemos um **n** de 10 ratos, perfazendo um total de 130 discos de tecido ósseo associados a tecido muscular. Cada fêmur gerou cerca de 6 a 7 discos uma vez que foram

descartadas as extremidades femorais tanto na região codilhar como na região de pata.

#### *Desmineralização e processamento dos espécimes*

Os 130 discos ósseos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos e desmineralizados a temperatura ambiente em soluções de ácido nítrico 5%, 10% e 20% (Grupo I), ácido fórmico 10%, 20% e 30% (Grupo II), ácido acético 10%, 20% e 30% (Grupo III), EDTA pH 7,4 a 5%, 10% e 20% (Grupo IV) e solução de Anna Morse (Grupo V).

As soluções de desmineralização foram submetidas à agitação repetida (47 agitações por minuto) com o auxílio de agitador de mesa (IKA Works, Brasil) e substituídas por novas soluções a cada 24 horas e com volume suficiente para cobrir 20 vezes o volume de cada disco. A avaliação da desmineralização foi realizada por método físico a cada 12 horas seguido por um método químico. O método físico envolveu agulhamento diário do osso cortical (agulha fina 30G, BD, Brasil) e o método químico foi o teste para a detecção de oxalato de cálcio na solução desmineralizadora (Farrell *et al.* 2015 ).

Após a desmineralização, os discos ósseos foram lavados em água destilada, em seguida desidratados em uma série de crescente de etanol, diafanizados com xilol, embebidos em parafina líquida e sólida. Secções teciduais de 3 µm de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (H & E), Tricrômio de Masson e Picrosirius. Na sequência, as lâminas foram desidratadas em série de álcool ascendente até o xilol e montadas com lamínulas fixadas com resina Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

#### *Medição do tempo e custo*

Foi medido o tempo em dias para a conclusão da desmineralização de cada solução. O custo financeiro em dólares para a realização das soluções foi baseado no cálculo do reagente necessário para obtenção do volume necessário para cobrir 20 vezes o volume do tecido (Suvarna *et al.* 2013) e o volume total para substituição a cada 24 horas de cada solução até a completa desmineralização.

#### *Análise microscópica*

As lâminas histológicas foram fotografadas usando microscópio de luz (Axiostar, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) conectado à câmera (Cannon, A620, San Jose, CA, EUA) e analisadas com *software* ImageJ (1.45s Wayne Rasband Institutos Nacionais de Saúde, EUA ). Cortes corados com H&E foram examinados para

calcular a porcentagem de lacunas ocupadas pelos osteócitos em sete campos sequenciados, em aumento de 400x e por um único observador (cego).

A análise semi-quantitativa foi aplicada para verificar a integridade do músculo adjacente ao osso e a preservação das fibras colágenas. Os cortes foram corados com Tricrômio de Masson em conjunto com Picrosirius sob polarização (Junqueira *et al*, 1979). Os critérios utilizados para as avaliações foram: inaceitável (-), baixa integridade (+), integridade moderada (++) ou alta integridade (+++).

No critério inaceitável (-), o tecido muscular apresentou-se amplamente desintegrado e não foram detectadas fibras colágenas preservadas. No critério baixa integridade (+), houve mínima preservação muscular e poucas fibras colágenas arranjadas frouxamente. Na integridade moderada (++), houve favorável preservação da morfologia muscular e fibras colágenas tipo I e II identificadas na polarização em média densidade. Na alta integridade (+++), houve integridade morfológica e celular do tecido muscular e as fibras colágenas do tipo I e II identificadas e arranjadas em alta densidade.

#### *Análises estatísticas*

Os valores foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças no tempo, custo e percentual de lacunas ocupadas por osteócitos entre os grupos foram testadas usando ANOVA e teste de múltiplas comparações de Tukey *post hoc*. A integridade muscular e das fibras colágenas foram testadas usando o teste exato de Fisher. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos. O software estatístico SPSS versão 18.0 foi utilizado para as análises.



**ANEXO A – PARECER SUBSTANCIADO DO CEUA****Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00940

**Título**

Análise histomorfométrica de tecido ósseo submetido a diferentes protocolos de desmineralização

**Data de Entrada**

18/09/2014

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

07/11/2014

**Considerações**

Ofício nº 204/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Rogério de Oliveira Gondak - Departamento de Patologia - ccs

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO COM CONDIÇÃO, por dois anos, para a utilização de dez ratos (*Rattus Norvegicus*).  
A condição é que as gaiolas tenham no máximo 5 animais.

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**  
**Data 07/02/2017**

Data 07/11/2014

**Parecer(es):**

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC**  
**PRESIDENTE**



## ANEXO B – GUIA DE INFORMAÇÕES AO AUTOR



### BONE

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 8756-3282

#### DESCRIPTION

*BONE* is an interdisciplinary forum for the rapid publication of original articles and reviews on basic, translational, and clinical aspects of bone and mineral metabolism. The Journal also encourages submissions related to interactions of bone with other organ systems, including cartilage, endocrine, muscle, fat, neural, vascular, gastrointestinal, hematopoietic, and immune systems. Particular attention is placed on the application of experimental studies to clinical practice.

#### US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Bone and Elsevier facilitate the author's response to the NIH Public Access Policy. For more details please see the [Guide for authors](#)

#### AUDIENCE

Bone Specialists, Orthopedists, Oncologists, Radiologists, Endocrinologists, Gynecologists, Rheumatologists, Cell and Molecular Biologists

#### IMPACT FACTOR

2014: 3.973 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

#### ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS  
Bioengineering Abstracts  
Elsevier BIOBASE  
Current Contents  
MEDLINE®  
EMBASE  
PASCAL/CNRS  
Reference Update

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**Sundeep Khosla**, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

### *Senior Editors*

**R. Eastell**, Northern General Hospital NHS Trust, Sheffield, UK

**N. Sims**, St. Vincent's Institute, Melbourne, Victoria, Australia

**S. Tanaka**, University of Tokyo, Tokyo, Japan

### *Reviews & Special Issue Editor*

**R. Baron**, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

### *Editors*

**M. Amling**, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

**J.E. Aubin**, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

**D. Burr**, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA

**M. Cooper**

**P. Croucher**, Garvan Institute of Medical Research, Sydney, New South Wales, Australia

**K. Ensrud**

**D. Fyhrie**, University of California at Davis, Medical Center, Sacramento, California, USA

**N. Gualabens**, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**M. Johnson**, University of Missouri at Kansas City, Kansas City, Montana, USA

**M. Kassem**, Odense University Hospital, Odense C, Denmark

**H. Kim**, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea

**B. Langdahl**, Aarhus University Hospital, Aarhus C, Denmark

**S. Majumdar**, University of California at San Francisco (UCSF), San Francisco, California, USA

**R. O'Keefe**, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA

**R. Recker**, Creighton University, Omaha, Nebraska, USA

**S. Takeda**, Keio University, Tokyo, Japan

### *Editorial Board*

**S. Adami**, Verona, Italy

**M.R. Allen**, Indianapolis, Indiana, USA

**N. Amizuka**, Niigata, Japan

**M. Ascenzi**, Los Angeles, California, USA

**T. Bellido**, Indianapolis, Indiana, USA

**M.L. Bianchi**

**H. Bone III**, Detroit, Michigan, USA

**L. Bonewald**, Kansas, Missouri, USA

**A. Boskey**, New York, New York, USA

**R. Bouillon**, Leuven, Belgium

**M. Bouxsein**, Boston, Massachusetts, USA

**B. Dawson-Hughes**, Boston, Massachusetts, USA

**B. de Crombrugge**, Houston, Texas, USA

**M.C. de Vernejoul**, Paris, France

**D. Dempster**, West Haverstraw, New York, USA

**A. Diez-Perez**, Barcelona, Spain

**S. Dixon**, London, Ontario, Canada

**F. Elefteriou**

**S.L. Ferrari**, Genève, Switzerland

**M. Forwood**, Gold Coast, Queensland, Australia

**S. Fukumoto**, Tokyo, Japan

**M. Garcia-Aznar**, Zaragoza, Spain

**J. Gasser**, Basel, Switzerland

**L. Gerstenfeld**

**M. Gillespie**, Clayton, Victoria, Australia

**M. Grynpas**, Toronto, Ontario, Canada

**H. Hagino**, Tottori City, Japan

**N. Harvey**, Southampton, England, UK

**J. Helms**, Stanford, California, USA

**D. Inoue**, Chiba, Japan

**R. Jilka**, Little Rock, Arkansas, USA

**D. Karasik**, Boston, Massachusetts, USA

**G. Karsenty**, New York, New York, USA

**T. Keaveny**, Berkeley, California, USA

**M. Kneissel**, Basel, Switzerland

**T. Komori**, Nagasaki, Japan  
**B. Kream**, Farmington, Connecticut, USA  
**R. Krumlauf**, Kansas City, Missouri, USA  
**J.M. Lane**, New York, New York, USA  
**B. Lanske**, Boston, Massachusetts, USA  
**J. Lian**, Worcester, Massachusetts, USA  
**J. Lorenzo**, Farmington, Connecticut, USA  
**C.W. Lowik**, Leiden, Netherlands  
**S. Manolagas**, Little Rock, Arkansas, USA  
**P. Marie**, Paris, France  
**R.J. Midura**, Cleveland, Ohio, USA  
**S. Mohan**, Loma Linda, California, USA  
**R. Mueller**, Zurich, Switzerland  
**K.W. Ng**, Melbourne, Victoria, Australia  
**J. Nyman**, Nashville, USA  
**C. O'Brien**  
**R. Okazaki**  
**E. Orwoll**, Portland, Oregon, USA  
**R. Pacifici**, Atlanta, Georgia, USA  
**S. Papapoulos**, Leiden, Netherlands  
**P. Peris**, Spain  
**J. Pettifor**, Johannesburg, South Africa  
**L. Plotkin**, Indianapolis, Indiana, USA  
**J. Quinn**, Melbourne, Victoria, Australia  
**F. Rauch**, Montréal, Canada  
**I. R. Reid, MD**, Auckland Mail Centre, Auckland, New Zealand  
**A. Robling**  
**M.J. Rogers**, Aberdeen, UK  
**E. Schipani**, Boston, Massachusetts, USA  
**E. Seeman, MD**, Melbourne, Victoria, Australia  
**Y. Selino**, Okayama, Japan  
**E. Shane**, New York, New York, USA  
**M. Silva**, St Louis, Missouri, USA  
**R. St. Arnaud**, Montreal, Quebec, Canada  
**G.S. Stein**, Burlington, Vermont, USA  
**N. Takahashi**, Nagano, Japan  
**H. Takayanagi**, Tokyo, Japan  
**Y. Takeuchi**, Tokyo, Japan  
**A. Teti**, L'Aquila, Italy  
**D. Towler**, St. Louis, Missouri, USA  
**W. Van Hul**, Antwerpen, Belgium  
**D. Vashishth**, Troy, New York, USA  
**S. Warden**, Bloomington, Indiana, USA  
**R. Weinstein**, Little Rock, Arkansas, USA  
**J.J. Westendorf**, Rochester, Minnesota, USA  
**M. Whyte, MD**, St. Louis, Missouri, USA  
**T. Wronski**, Gainesville, Florida, USA  
**A. Yamaguchi**, Tokyo, Japan  
**Y. Yeni**, Detroit, Michigan, USA  
**T. Yoneda**, Suita-Shi, Osaka, Japan

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

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

#### *Types of article*

Types of articles Bone accepts include:

- 1) Memoriam
- 2) Editorial or Commentary
- 3) Review
- 4) Original Articles
- 5) Rapid Communication
- 6) Case Report
- 7) Technical Note
- 8) Letters and Response to Letter to the Editor
- 9) Erratum/Corrigendum
- 10) Announcements

There are no length or format requirements other than those already shown on the GFA under Article Structure.

## **BEFORE YOU BEGIN**

### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

### *Human and animal rights*

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

### *Conflict of interest*

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/supporthub/publishing](http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing).

### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published

elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

#### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

#### **Changes to authorship**

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

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

#### **Article transfer service**

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

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

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

#### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

#### **Role of the funding source**

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

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

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

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 1950**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### **Green open access**

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### **Submission**

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

### **Referees**

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

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

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

### **References**

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

### **Formatting requirements**

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

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

### **Figures and tables embedded in text**

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### **Use of word processing software**

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

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

### **Article structure**

#### **Subdivision - numbered sections**

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

### Introduction

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

### Material and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Since there are significant differences in skeletal structure and remodeling between the sexes and strains, it is essential that all animal studies report the age, sex, and strain (e.g., C57BL/6) of animals used.

### Theory/calculation

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

### Results

Results should be clear and concise.

### Discussion

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

### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Essential title page information

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

### Abstract

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

### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use *Highlights* in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### Keywords

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

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

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

### Genbank

### Footnotes

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

### Electronic artwork

#### General points

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

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

#### Formats

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

- EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
- TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
- TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
- TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### Please do not:

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

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

**Information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Illustration services**

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### **Figure captions**

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

### **Tables**

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

### **References**

#### **Citation in text**

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

#### **Reference links**

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

#### **Web references**

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

#### **References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### **Reference management software**

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/bone>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference formatting*

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

#### *Reference style*

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

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

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

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

#### *Video data*

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

#### *AudioSlides*

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### *Supplementary material*

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel

