



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

ÉRICA ARAÚJO DE OLIVEIRA

**Padronização metodológica para o estudo
microscópico da região intertrocântérica e colo
femoral de rato**

ARAÇATUBA - SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

ÉRICA ARAÚJO DE OLIVEIRA

**Padronização metodológica para o estudo
microscópico da região intertrocantérica e colo
femoral de rato**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Marcelo Macedo Crivelini

ARAÇATUBA - SP

2015

À Marlúcia Maria Lima Araújo, minha mãe, e Margarida Maria Veado de Oliveira, minha avó paterna, com muito amor, respeito e gratidão por tudo o que representam para mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido o dom da vida e por não me deixar esmorecer perante os obstáculos pelo caminho. Ele me concedeu forças quando precisei e manteve minha fé e persistência apesar e por causa das dificuldades encontradas.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar o sonho de ingressar em uma excelente faculdade.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pois aqui obtive a base não somente para me tornar uma cirurgiã-dentista, mas crescer como pessoa.

Ao professor Dr. Marcelo Macedo Crivelini, por quem tenho imensa admiração, por sua carreira e pelo ser humano que é, por sua fé e pelo modo que conduz também sua família. Obrigada pela paciência e por todo apoio e orientação durante a condução do trabalho.

Ao aluno de doutorado em Ciências Fisiológicas pela FOA-Araçatuba, Wagner Garcez de Mello, pelos ensinamentos e pelo tempo dispendido em me passar as orientações para a correta execução do trabalho. Desculpe-me por ter sido tão pentelha, em algumas vezes. Agradeço imensamente pela disposição e por se fazer tão presente durante a execução do trabalho, sem sua ajuda nada teria sido possível.

Ao professor João César Bedran de Castro, por sua simplicidade e pelo jeito leve de conduzir a vida. Obrigada pelas histórias e por ser um professor tão cativante.

À mestra em fisiologia pelo Departamento de Ciências Fisiológicas da FOA-Araçatuba, Noelle Egídia Watanabe Kiill, por toda a paciência e disposição para ajudar no que fosse necessário. Agradeço também por sua amizade e por todos os momentos de aleatoriedades.

Ao técnico do laboratório de Patologia, Marcelo Tramarin, a quem me faltam palavras para agradecer tudo o que fez por mim desde que comecei a fazer estágio

no departamento. Fosse com uma carona ou ensinando exaustivamente o modo correto de realizar os cortes histológicos, nunca lhe faltaram paciência e boa vontade, além, claro, da animação. Obrigada por tudo Marcelinho.

À técnica do laboratório de Patologia, Giseli Mitsuy Kayahara, pelo tempo dispendido em me ajudar todas as vezes em que precisei... e não foram poucas! Agradeço toda a paciência e admiro seu esforço diário, trabalhando e estudando. Obrigada também por ouvir e rir, quando pertinente, das minhas histórias aleatórias, e por aceitar relativamente a zoeira.

À minha mãe, Marlúcia Maria Lima Araújo, pelo exemplo que sempre foi para mim. Por ser minha base, quem forneceu ajuda sempre que precisei... quem esteve e está ao meu lado nos bons e maus momentos... quem dá um jeito, mesmo quando ele parece não existir... quem não mede esforços para tentar me ver sempre feliz. Te amo infinitamente.

À minha avó, Margarida Maria Veado de Oliveira, por ter cuidado de mim desde pequena, por ter me ensinado a rezar e por ser tão incrível e maravilhosa! Te amo mini linda.

Ao meu irmão Paulo Sérgio de Oliveira Filho, por estar sempre ao meu lado... pelas conversas, pelas risadas, pelas brigas... nada teria graça se não tivesse você! Te amo muito, pra sempre.

Ao meu pai, Paulo Sérgio de Oliveira, por quem tenho imenso respeito e admiração. Mesmo morando tão longe, agradeço pelo carinho e preocupação de sempre. Te amo.

À minha prima, Letícia da Silva Araújo, à minha tia Ana Rezende e ao meu tio André Araújo, que estão hoje junto a Deus. Agradeço por todos os momentos bons que vivemos juntos aqui na terra, sinto a falta de vocês.

Aos meus avós, tios, primos e primas que me apoiaram desde que ingressei na faculdade.

Aos meu amigos/irmãos que a faculdade proporcionou Jéssica Paula, Fred Lucas, Emilie, Camilinha, Jana, Lidi, Denise, Cecília, Marcela Fernanda, Isa Zacarin, Vanessa. Obrigada por todo o carinho, por toda a zoeira e por tudo que aguentaram de mim nesses anos.

Aos demais amigos que fiz em Araçatuba.

Aos amigos da minha cidade natal Eduardo, Mariana, Fernanda, Marcela, Bruna Maria e Ana Elisa.

A todos que em algum momento se fizeram presentes durante essa jornada...

MUITO OBRIGADA.

“O mundo está nas mãos daqueles que tem a coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos”.

(Paulo Coelho)

OLIVEIRA, EA. **Padronização metodológica para o estudo microscópico da região intertrocanterica e colo femoral de rato**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

Pesquisas tem analisado microscopicamente a estrutura óssea femoral de ratos, especialmente nas regiões em que fraturas são frequentes no osso correspondente humano: colo e segmento intertrocanterico. No entanto, não existe uma padronização metodológica para a orientação do corte histológico e coleta de dados, e os resultados microscópicos geralmente se restringem a descrições das áreas observadas. O objetivo deste trabalho foi propor um padrão metodológico confiável de processamento histológico, para garantir a obtenção de cortes semelhantes. Para tanto, fêmures de 10 a 15 ratas fêmeas e 10 a 15 de machos com 120 dias de idade foram processados seguindo procedimentos específicos de macroscopia e microtomia, e analisados microscopicamente por imagens, histometria e cálculos estatísticos. Os dados comprovaram a eficácia da metodologia, permitindo a obtenção de cortes no mesmo nível da peça, com dimensões de área, largura e diâmetro semelhantes.

Palavras-chave: Fêmur, trocanter, metodologia.

OLIVEIRA, EA. **Methodological standardization for the microscopic study of the rat femoral neck and intertrochanteric region.** 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

Researches have microscopically analyzed the femoral bone structures of rats, especially in areas where fractures are frequent in human bone: femoral neck and intertrochanteric area. However, there is no standardization for the guidance of the histological section, neither data collection, and the microscopic findings generally are limited to descriptions of the interested areas. The aim of this study was to propose a reliable methodological standard for histological processing of femoral bone to ensure obtaining similar cuts for microscopic analysis. To this end, femurs of female (n=10-15) and male (n=10-15) rats, aged 120 days, were processed following specific procedures for macroscopy and microtomy. These were assessed by photomicrographies, histometry and statistical analysis. The results supported the methodologic efficacy, allowing obtain cuts at the same femur level, showing similar dimensions of area, width and diameter.

Keywords: Femur, trochanter, methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fêmur : região do seccionamento transversal	17
Figura 2 -	Níveis para secção	18
Figura 3 -	Níveis seccionados na lâmina	18
Figura 4 -	Imagem original	20
Figura 5 -	Imagem processada da área total	20
Figura 6 -	Imagem original	21
Figura 7 -	Imagem processada da área óssea	21
Figura 8 -	Imagem original	23
Figura 9 -	Imagem processada da área cortical	23
Figura 10 -	Imagem original	24
Figura 11 -	Diâmetro ósseo total	24
Figura 12 -	Largura da cortical do lado esquerdo	25
Figura 13 -	Largura da cortical do lado direito	25
Figura 14 -	Diâmetro do osso esponjoso	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Áreas: total, óssea, cortical e do espaço trabecular em fêmeas	27
Tabela 2 -	Áreas: total, óssea, cortical e do espaço trabecular em machos	27
Tabela 3 -	Diâmetro: ósseo total, largura da cortical dos lados esquerdo e direito e osso esponjoso em fêmeas	28
Tabela 4 -	Diâmetro: ósseo total, largura da cortical dos lados esquerdo e direito e osso esponjoso em machos	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ACDE-DEXA = absorciometria com raios-X de dupla energia

Ar.Ct = área da cortical

Ar.Me = área medular

Ar.O = área óssea

Ar.T = área total

ASBMR = The American Society of Bone and Mineral Research

BCF = base do colo femoral

BRI = base da região intertrocântica

Dm.O = diâmetro ósseo total

Dm.OEs = diâmetro do osso esponjoso

DMO = densidade mineral óssea

DXA = absorciometria por dupla emissão de raios-x

H.E. = hematoxilina e eosina

ICF = intermediário do colo femoral

IMC = índice para a corticometáfise

IRI = intermediário da região intertrocântica

La.Ct = largura da cortical

Leica QWin = Image Processing and Analysis System

TBS = Trabecular Bone Score

Sumário

1 Introdução	14
2 Objetivo	16
3 Materiais e Métodos	17
3.1 Forma de análise dos resultados	19
3.2 Análises Estatísticas	26
4 Resultados	27
5 Discussão	29
6 Conclusão	31
Referências	32
Anexos	34

1 Introdução

A qualidade dos resultados de uma pesquisa está diretamente relacionada à escolha de um método científico objetivo e confiável, que produza evidências científicas facilmente perceptíveis e reprodutíveis. Os resultados preferencialmente devem ser traduzidos por números, e testados sob o aspecto estatístico com o objetivo de validá-los de modo imparcial. Na pesquisa de tecidos orgânicos por observação histológica e histopatológica comumente se recorre à contagem e/ou histometria de células e estruturas específicas, calculando-se áreas em micrômetros-quadrado (μm^2) e distâncias em micrômetros (μm). Outro ponto importante do método científico refere-se ao número de amostras, que deve ter representatividade, e à padronização do objeto que é analisado, que deve ser o mesmo dentre as amostras. Para tanto, é importante estabelecer protocolos metodológicos padronizados.

Pesquisas do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba-UNESP e Sociedade Brasileira de Fisiologia), especialmente aqueles das linhas “Fisiologia Endócrina” e “Fisiologia do Exercício Físico”, tem analisado a estrutura óssea femoral de ratos, especialmente nas regiões em que a incidência de fraturas é frequente no osso humano: colo e segmento intertrocântérico. Para tanto, diversos métodos de análise tem sido aplicados, dentre eles o estudo histológico por colorações diversas, a absorciometria com raios-X de dupla energia – ACDE-DEXA -, testes biomecânicos e tomografias computadorizadas (HAMANN et al., 2013; MELLO et al., 2012). A motivação destas pesquisas é pelo fato da osteoporose estar acometendo cada vez mais a população de idosos, afetando de modo significativo a microarquitetura óssea e a densidade mineral óssea (DMO). Uma das consequências da fragilidade óssea são as fraturas, que ficam mais susceptíveis de ocorrer especialmente nas regiões de punho, vértebras e fêmur (PAIVA et al., 2002). Nos jovens, a incidência de fratura femoral tem aumentado em razão do crescente número de acidentes automobilísticos (ARIYOSHI, 2013).

O estudo microscópico do fêmur, no entanto, carece de aprimoramento na padronização metodológica da técnica histológica, especialmente na orientação do corte e coleta de dados. Em geral os cortes histológicos são longitudinais ou transversais, cujas análises envolvem diferentes regiões, sem detalhes metodológicos que justificariam a escolha das áreas. Isto obviamente torna improvável que o mesmo nível de corte esteja sendo analisado em todas as amostras de grupos de uma pesquisa. Além do mais, os resultados não raro se restringem a descrições histomorfológicas (BUSSARD et al., 2010; SILVESTRINI et al., 2005; UUSITALO et al., 2001).

Por outro lado, a literatura apresenta uma padronização internacional a respeito das unidades de medida, símbolos e nomenclatura para pesquisa de tecido ósseo e minerais, idealizada pela “The American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR)”. Tal padronização permite a melhor comunicação internacional da sociedade científica quando se refere ao tecido ósseo, no uso de suas especificações, definições, termos, e abreviaturas. Também existem propostas de adequações no estudo da microarquitetura óssea pela histomorfometria, atentando-se à organização espacial das trabéculas, conectividade e volume de seus tecidos (DALLE CARBONARE et al., 2005; PARFITT, 1988).

2 Objetivo

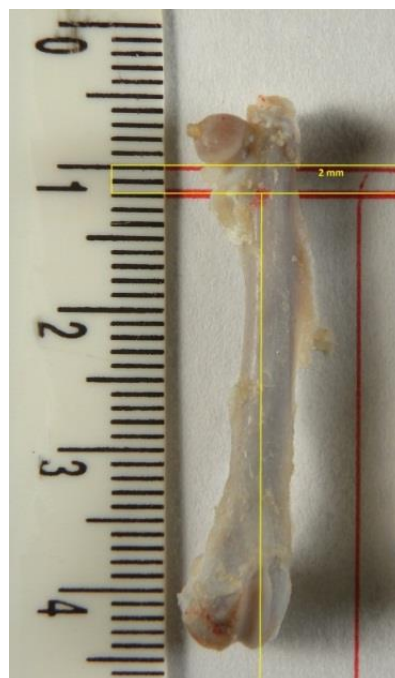
Em virtude da ausência de um padrão metodológico a ser seguido para a histologia de fêmures de ratos, o objetivo deste trabalho foi propor um método confiável e reprodutível, particularmente voltado para a região intertrocantérica e de colo. Pretende-se assim garantir que, nas diferentes amostras teciduais dos grupos de animais, seja analisado o mesmo nível de corte histológico com estruturas, populações celulares e dimensões histométricas semelhantes.

3 Materiais e Métodos

Ratos machos (n= 10-15) e fêmeas n= (10-15, *Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) foram criados em gaiolas à temperatura ambiente controlada, e alimentados com ração comercial padrão e água *ad libitum*. Ao atingirem a idade de 120 dias, foram sacrificados através de dose excessiva de anestésico para a dissecação dos ossos femorais. Os ossos foram fixados em formol tamponado a 10% por 48 horas e desmineralizados na solução de Plank-Richlo por 8 dias. Em seguida, foram submetidos à técnica histológica de rotina para inclusão e obtenção de cortes histológicos observando-se os seguintes procedimentos macroscópicos e de microtomia:

1) Os fêmures do lado direito foram seccionados transversalmente na região de metáfise, exatamente 02 mm abaixo da linha imaginária que tange o limite inferior da cabeça do fêmur, preservando a região intertrocantérica e colo femoral.

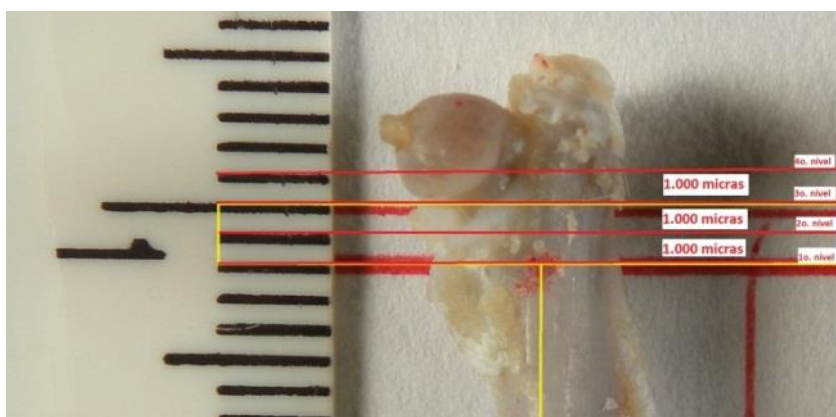
Figura 1 - Fêmur: região do seccionamento transversal



Fonte: Prof. Adj. Dr. Marcelo Macedo Crivelini

2) O segmento metafisário foi incluído em parafina com a face de secção voltada para a face de corte histológico. Quatro níveis foram estabelecidos para o corte histológico, equidistantes em 1.000 μm . São eles: 1º. Nível: base da região intertrocantérica (BRI); 2º. Nível: intermediário da região intertrocantérica (IRI); 3º. Nível: base do colo femoral (BCF); 4º. Nível: intermediário do colo femoral (ICF).

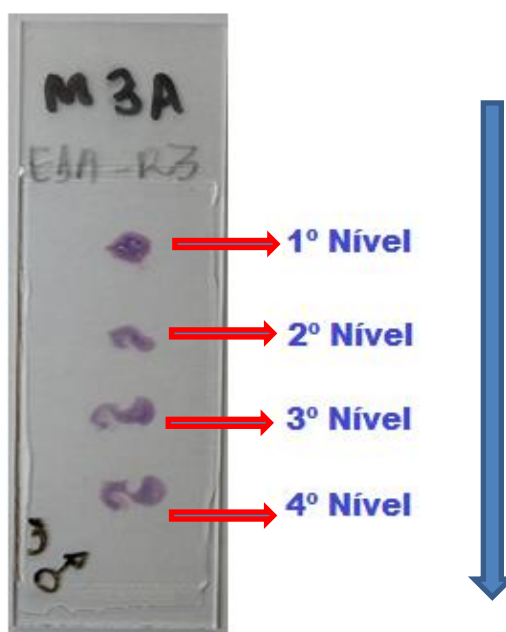
Figura 2 - Níveis para secção



Fonte: Prof. Adj. Dr. Marcelo Macedo Crivelini

3) Os cortes histológicos tiveram 03 μm de espessura, e os níveis foram posicionados na mesma lâmina, em seqüência crescente a partir da etiqueta de identificação.

Figura 3 - Níveis seccionados na lâmina



Fonte: Do Autor

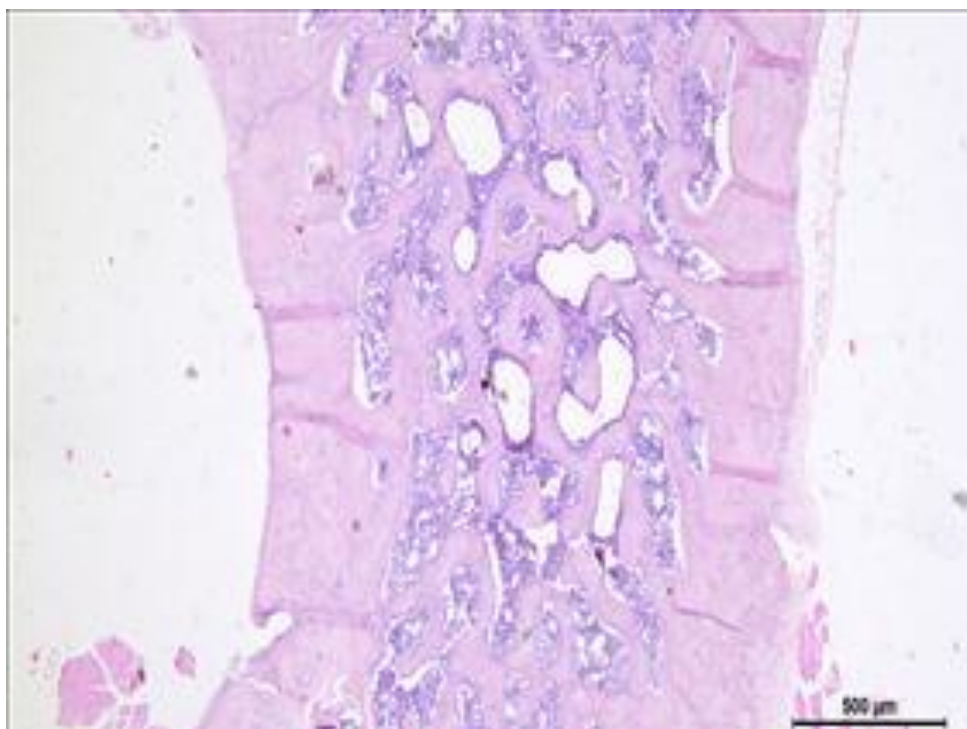
Cada fêmur teve três lâminas confeccionadas nestas características, sendo uma utilizada para coloração H.E. (hematoxilina e eosina) e análise microscópica, e duas de reserva para eventual repetição de coloração.

3.1 Forma de análise dos resultados

Todos os cortes histológicos foram corados em H.E., observados por microscopia de luz, e fotomicrografados em aumentos de X50. A partir das imagens digitais, dados histométricos da região BCF foram coletados pelo programa computacional Leica QWin (Image Processing and Analysis System) pela mensuração em μm^2 das seguintes estruturas:

a) área total (BCF-Ar.T), que abrangeu toda área do corte histológico;

Figura 4 - Imagem original.



Fonte: Do Autor

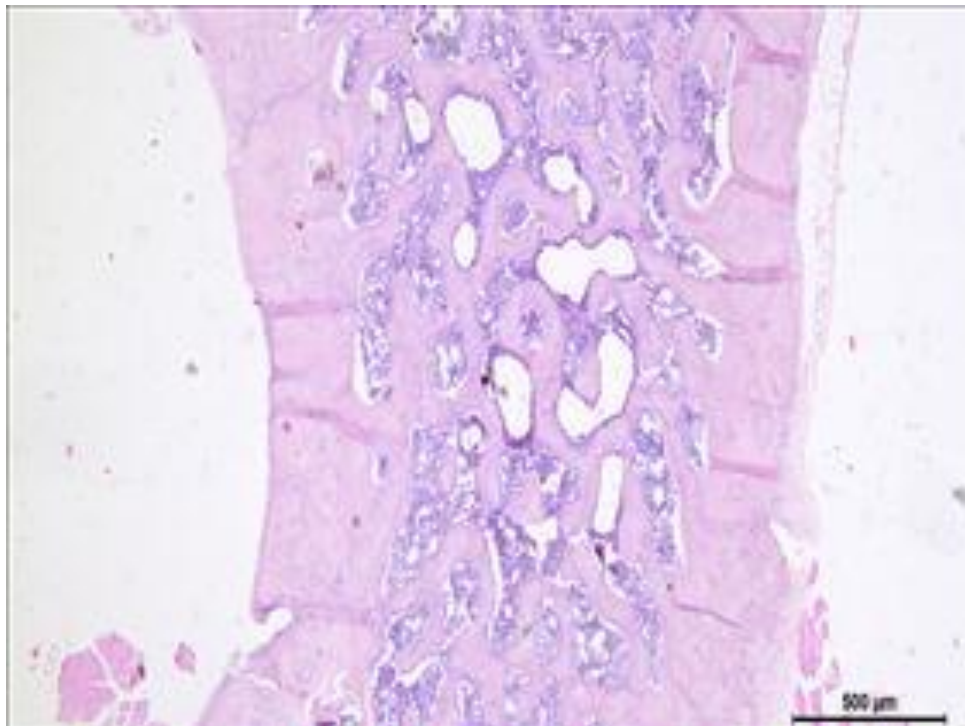
Figura 5 - Imagem processada da área total.



Fonte: Do Autor

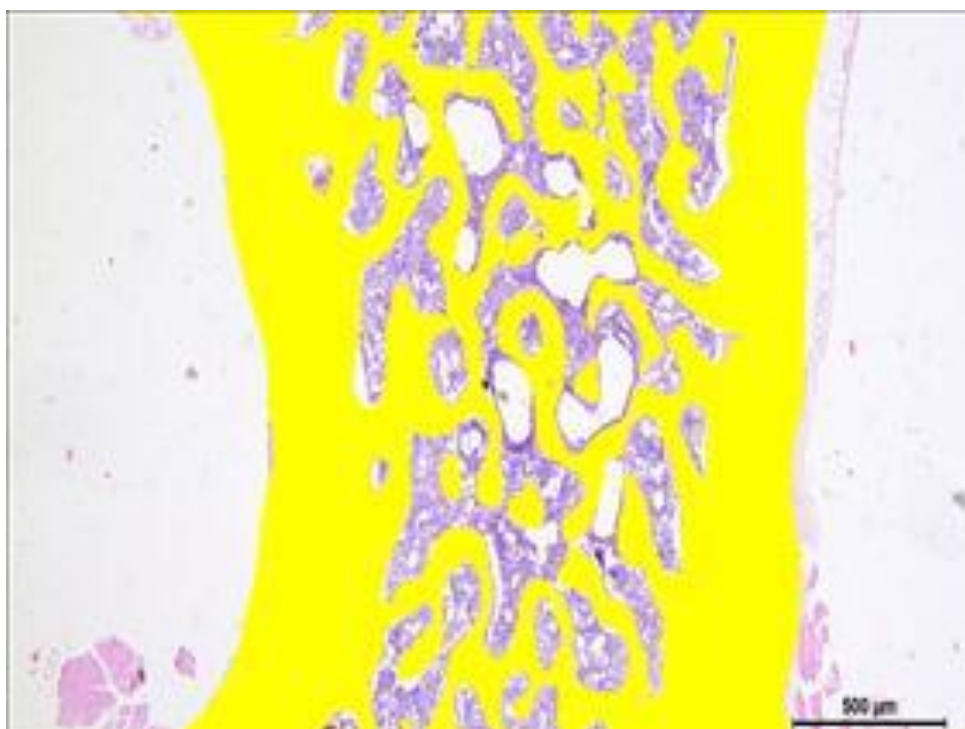
b) área óssea (BCF-Ar.O), compreendendo apenas o tecido mineralizado;

Figura 6 - Imagem original.



Fonte: Do Autor

Figura 7 - Imagem processada da área óssea.



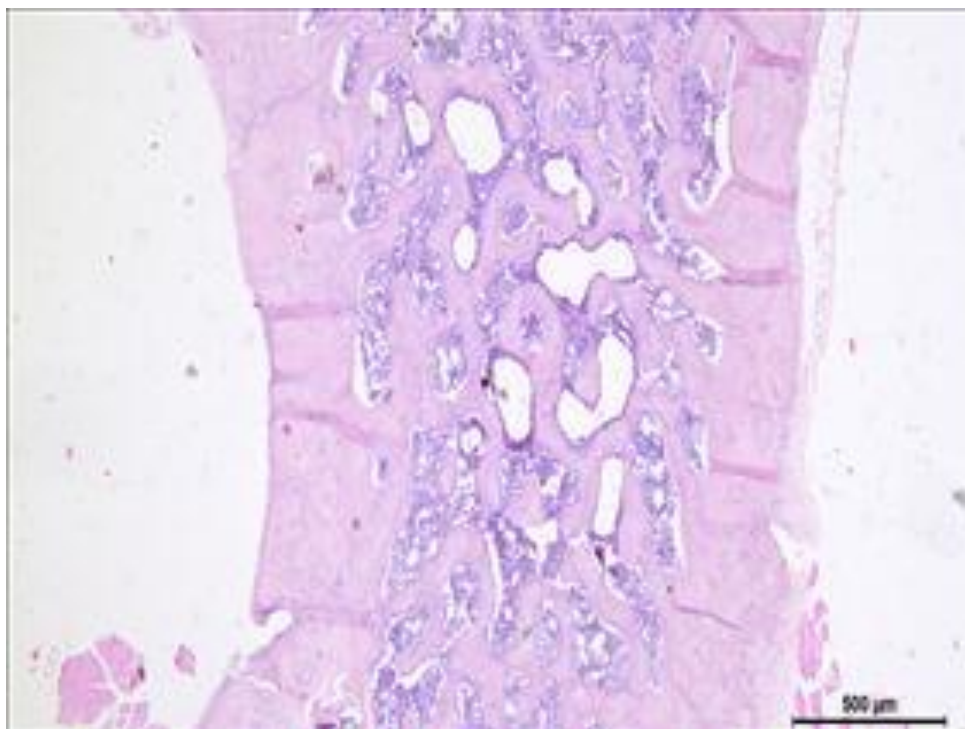
Fonte: Do Autor

c) área medular (BCF-Ar.Me), representado pelo tecido medular;

- A área do tecido medular foi obtida através da subtração da área óssea a partir da área total.

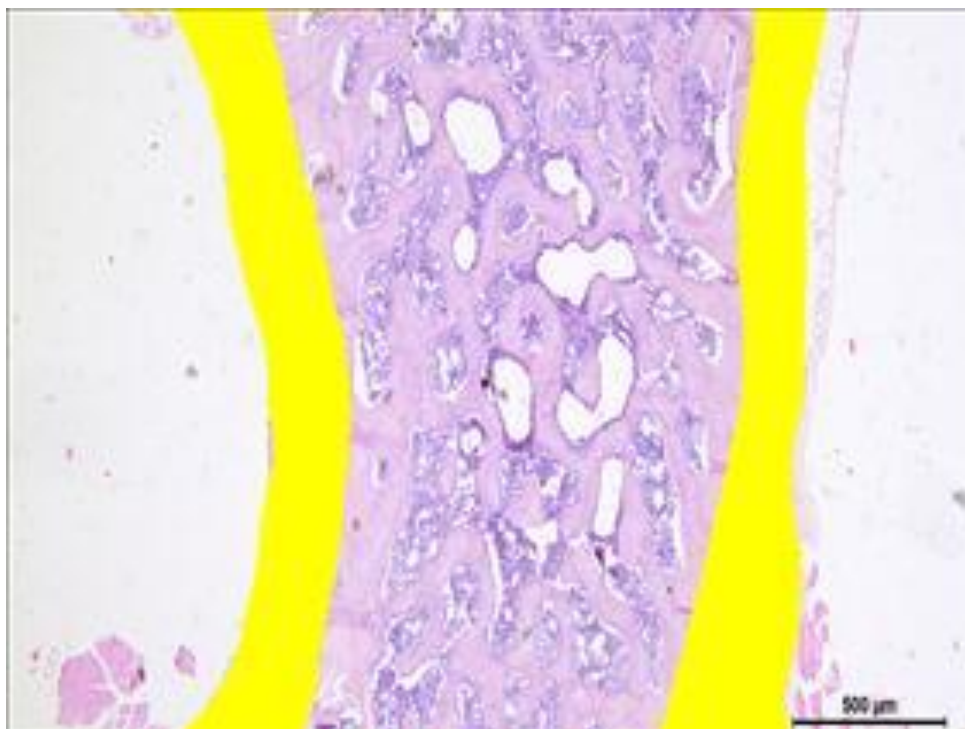
d) área da cortical (BCF-Ar.Ct);

Figura 8 - Imagem original.



Fonte: Do Autor

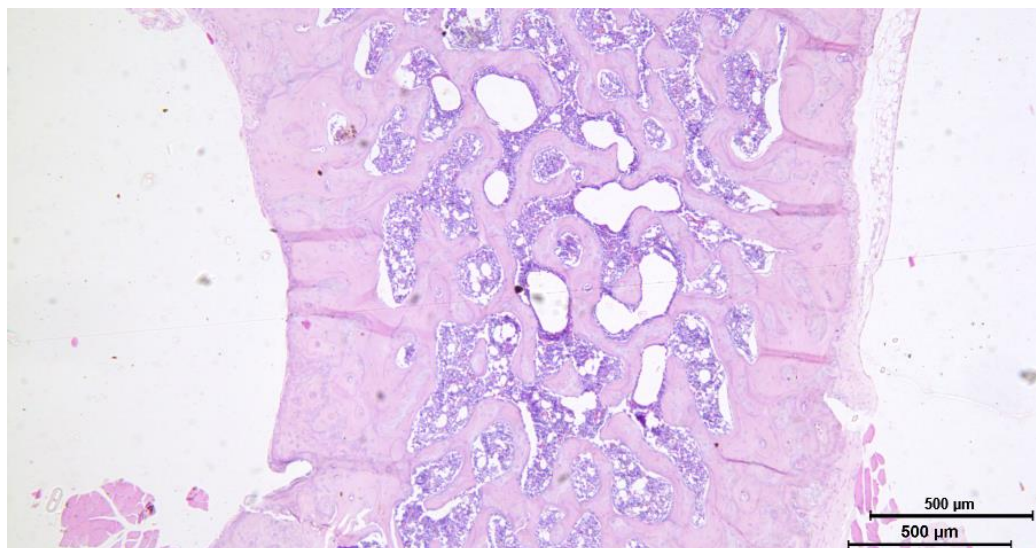
Figura 9 - Imagem processada da área cortical.



Fonte: Do Autor

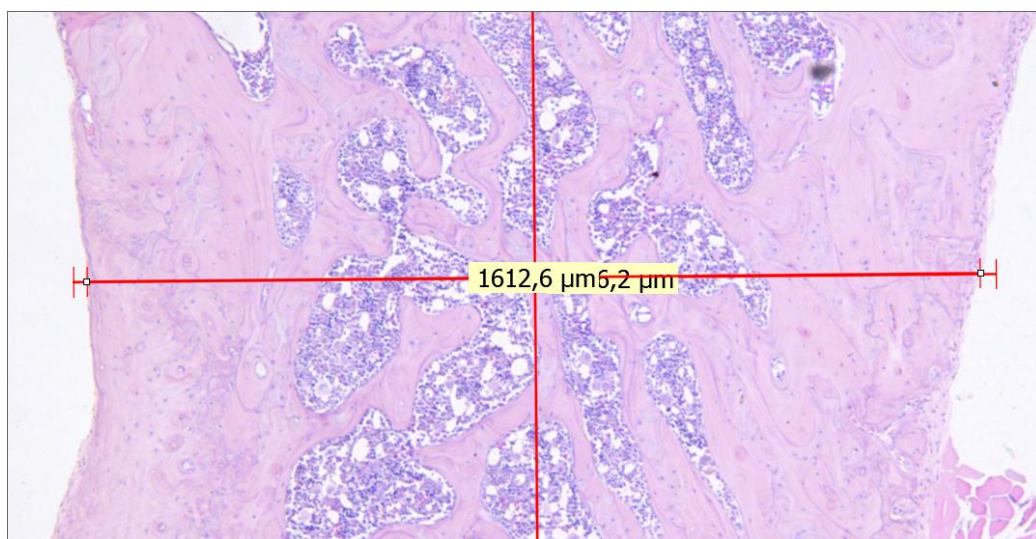
e) diâmetro ósseo total (ICF-Dm.O);

Figura 10 - Imagem original.



Fonte: Do Autor

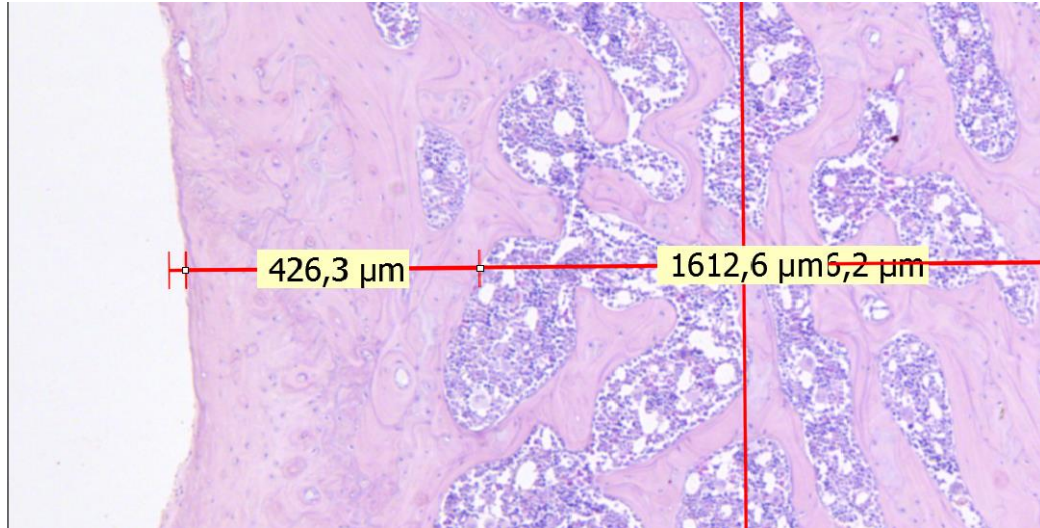
Figura 11 - Diâmetro ósseo total.



Fonte: Do Autor

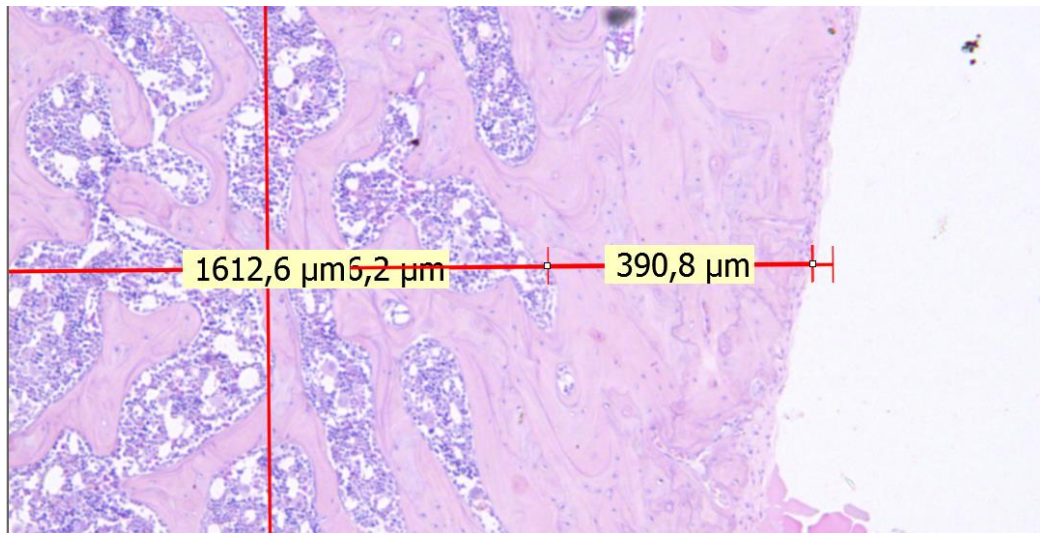
f) largura da cortical (ICF- La.Ct) e,

Figura 12 - Largura da cortical do lado esquerdo.



Fonte: Do Autor

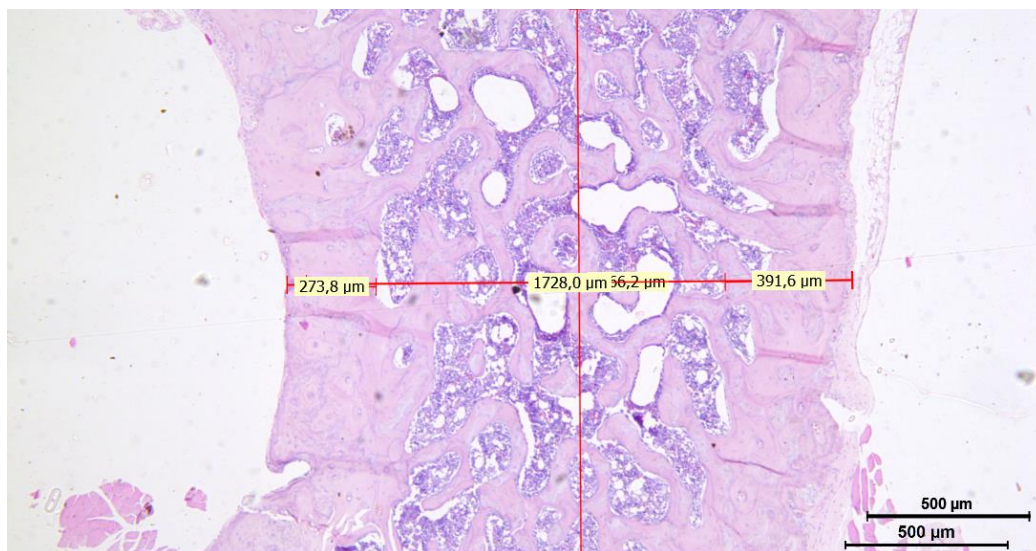
Figura 13 - Largura da cortical do lado direito.



Fonte: Do Autor

g) diâmetro do osso esponjoso (ICF-Dm.OEs).

Figura 14 - Diâmetro do osso esponjoso



Fonte: Do Autor

3.2 Análises Estatísticas

Os dados numéricos foram submetidos ao teste de normalidade e, conforme os resultados obtidos, os testes estatísticos denominados D'Agostino & Pearson e Shapiro- Wilk, foram aplicados. Por fim, foram definidos parâmetros histométricos médio e de tolerância para considerar o corte histológico ideal para análise.

4 Resultados

As áreas BCF-Ar.T, BCF-Ar.O, BCF-Ar.Me, BCF-Ar.Ct, os diâmetros ICF-Dm.O, ICF-Dm.OEs e a largura ICF- La.Ct demonstraram pequenas variações de valor dentre as amostras, e foram considerados estatisticamente semelhantes pelos testes aplicados. As tabelas 1 e 2 mostram os valores médios referentes às áreas total, óssea, cortical e do espaço trabecular. Os valores do diâmetro ósseo total, largura da cortical dos lados esquerdo e direito e osso esponjoso estão representados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 1 - Áreas: total, óssea, cortical e do espaço trabecular em fêmeas

	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIÇÃO
BCF-Ar.T (μm^2)	2876985,8 ± 199804,6	6.94%
BCF-Ar.O (μm^2)	2037900,8 ± 139172,8	6.83%
BCF-Ar.Ct (μm^2)	949361,0 ± 98117,6	8.55%
BCF-Ar.Me (μm^2)	839084,9 ± 839084,9	24.78%

Análises Estatísticas: Os dados foram expressos em Média±Desvio Padrão e Coeficiente de Variação.

Fonte: Do Autor

Tabela 2 - Áreas: total, óssea, cortical e do espaço trabecular em machos

	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIÇÃO
BCF-Ar.T (μm^2)	3378678,3 ± 392017,5	11.60%
BCF-Ar.O (μm^2)	2312830,5 ± 222514,3	9.62%
BCF-Ar.Ct (μm^2)	1047165,7 ± 144113,3	13.76%
BCF-Ar.Me (μm^2)	1065847,8 ± 217398,4	20.40%

Análises Estatísticas: Os dados foram expressos em Média±Desvio Padrão e Coeficiente de Variação.

Fonte: Do Autor

Tabela 3 – Diâmetro: ósseo total, largura da cortical dos lados esquerdo e direito e osso esponjoso em fêmeas

	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIÇÃO
ICF-Dm.O (μm)	1600,3 ± 126,0	7.87%
ICF- La.Ct (LADO ESQUERDO) (μm)	333,9 ± 47,4	10.79%
ICF- La.Ct (LADO DIREITO) (μm)	332,5 ± 62,4	18.76%
ICF-Dm.OEs (μm)	954,8 ± 178,9	18.74%

Análises Estatísticas: Os dados foram expressos em Média ± Desvio Padrão e Coeficiente de Variação.

Fonte: Do Autor

Tabela 4 - Diâmetro: ósseo total, largura da cortical dos lados esquerdo e direito e osso esponjoso em machos

	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIÇÃO
ICF-Dm.O (μm)	1913,1 ± 207,4	6.75%
ICF- La.Ct (LADO ESQUERDO) (μm)	360,7 ± 81,0	17.75%
ICF- La.Ct (LADO DIREITO) (μm)	415,0 ± 125,8	25.37%
ICF-Dm.OEs (μm)	1137,4 ± 333,9	15.42%

Análises Estatísticas: Os dados foram expressos em Média ± Desvio Padrão e Coeficiente de Variação.

Fonte: Do Autor

As análises foram expressas em valores de média ± desvio padrão, além do coeficiente de variação. A média e o desvio padrão foram obtidos pelo software Microsoft Excel, concomitantemente aos testes para valores de normalidade. Os valores para o coeficiente de variação foram obtidos a partir do uso do programa Prism, com uma significância de 95%, utilizando os testes de D'Agostino & Pearson e Shapiro- Wilk para valores de normalidade.

5 Discussão

A biologia óssea tem sido estudada por meio de várias metodologias, e seus resultados devem ser adequadamente compilados para produzirem discussões e conclusões válidas acerca de temas específicos sobre o assunto. Tal variedade metodológica é facilmente constatada ao se fazer uma leitura aleatória de artigos científicos, que são publicados rotineiramente e em grande número.

Benhamou (2007), por exemplo, avaliou os minerais contidos no osso cortical e trabecular através do uso da microrradiografia e microtomografia computadorizada. Em seu artigo, afirmou que na prática clínica a avaliação quantitativa de tecido tem sido baseada na absorciometria por dupla emissão de raios X, obtendo-se valores para DMO e associando os resultados ao risco de fratura em função da ocorrência da osteoporose. Propriedades ósseas como a resistência mecânica, a microarquitetura óssea, a mineralização tecidual seriam dependentes do turnover e suas variações.

Silva e Bilezikian (2014) utilizaram um novo método para averiguar a microarquitetura óssea: o “Trabecular Bone Score” (TBS – score para osso trabecular). Através de imagens de densitometria óssea da coluna lombar, o método correlacionou volume ósseo, disposição e número das trabéculas, além de sua separação, por meio de microtomografia computadorizada. Pelo TBS, estudos demonstraram a associação do score com o risco de fratura de colo femoral.

Araneta et al. (2009) associaram a adiponectina à DMO, fraturas e perdas ósseas. Células formadoras de osso possuíam a adiponectina em sua composição. Associando as diferenças sexuais com resultados da associação adiponectina-DMO, os autores realizaram um estudo transversal com análise multivariada, envolvendo fatores como idade, peso, diabetes tipo 2, consumo de cálcio, consumo de álcool e prática de exercícios. A qualidade óssea foi averiguada a partir de absorciometria por dupla emissão de raios-x (DXA) e por absorciometria simples por fótons.

No presente trabalho, avaliamos um dos métodos importantes, e amplamente utilizado para a pesquisa óssea: a histologia e histomorfometria. Propusemos obter cortes histológicos transversais da diáfise femoral de ratos que fossem semelhantes dentre as amostras planejadas, para que a coleta de dados histométricos fosse confiável. Nossos resultados numéricos mostraram valores próximos, com variações de até 25%, o que é considerado aceitável para uma amostra biológica. Estatisticamente verificamos que não houve diferença significativa nos números, garantindo assim a confiabilidade da metodologia. A relevância deste estudo se dá em função da maior precisão a respeito da localização da área de interesse, visto que existem diversas formas para análise de risco de fratura, densidade óssea, microarquitetura óssea, porém, nenhuma com um cuidado especial quanto à localização da área a ser avaliada.

6 Conclusão

O padrão metodológico proposto foi eficaz para a obtenção de cortes histológicos padronizados de fêmures de ratos, e permitiu um acesso mais preciso à área de interesse. As amostras apresentaram resultados homogêneos, garantindo confiabilidade para futuras pesquisas que se propõem a realizar histomorfometria da região intertrocantérica e colo femoral.

Referências

- ARANETA, M. R. G. et al. Sex differences in the association between adiponectin and bmd, bone loss, and fractures: the rancho bernardo Study. **J. Bone Miner. Res.**, v. 24, n. 12, p. 2016-2022, 2009.
- ARIYOSHI, A. F. **Características epidemiológicas das fraturas do fêmur proximal tratadas na Santa Casa de Misericórdia de Batatais - SP**. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.
- BALDERRAMA, V. L. et al. Radiologic correlation between the cortical - shaft index and bone mineral density in the diagnosis of osteoporosis. **Acta Ortop. Mex.** , v.21, n. 2, p. 77-84, 2007.
- BENHAMOU, C. L. Effects of osteoporosis medications on bone quality. **Joint Bone Spine**, v. 74, n. 1, p. 39–47, 2007.
- BUSSARD, K.M. et al. Localization of osteoblast inflammatory cytokines MCP-1 and VEGF to the matrix of the trabecula of the femur, a target area for metastatic breast cancer cell colonization. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 27, p. 331–340, 2010.
- DALLE CARBONARE, L. et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron**, v. 36, n. 7-8, p. 609–616, 2005.
- HAMANN, C. et al. Sclerostin antibody treatment improves bone mass, bone strength, and bone defect regeneration in rats with type 2 diabetes mellitus. **J. Bone Miner. Res.**, v. 28, n.3, p. 627–638, 2013.
- MELLO, W.G. et al. Effects of neonatal castration and androgenization on sexual dimorphism in bone, leptin and corticosterone secretion. **Bone**, v.50, p.893-900, 2012.

PAIVA, L. C. et al. Impact of degenerative radiographic abnormalities and vertebral fractures on spinal bone density of women with osteoporosis. **São Paulo Med. J.**, v. 120, n. 1, p. 9–12, 2002.

PARFITT, A. M. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. **Calcified Tissue Int.**, v. 42, n. 5, p. 284–286, 1988.

SILVA, B. C.; BILEZIKIAN, J. P. Trabecular bone score: perspectives of an imaging technology coming of age. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 58, n. 5, p. 493–503, 2014.

SILVESTRINI, G. et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. **J. Mol. Hist.**, v. 36, p. 59–67, 2005.

UUSITALO, H. et al. A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. **Bone**, v. 28, n. 4, p.423–429, 2001.

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Padronização metodológica para o estudo microscópico da região intertrocanterica e colo femoral de rato**", Processo FOA nº 2014-00594, sob responsabilidade de Marcelo Macedo Crivelini apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Setembro de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 11 de Maio de 2015.


DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 11 de Junho de 2015.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Methodological standardization for the microscopic study of the rat femoral neck and intertrochanteric region**", Protocol FOA nº 2014-00594, under the supervision of Marcelo Macedo Crivelini presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 24, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 11, 2015.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 11, 2015.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br