UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

INFLUÊNCIA DO LASER TERAPÊUTICO NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO DE RATOS SUBMETIDOS À AUSÊNCIA DE CARGA

Nandressa Dayna Mendes Riso

Fisioterapeuta

ARAÇATUBA – SP

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA E CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

INFLUÊNCIA DO LASER TERAPÊUTICO NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO DE RATOS SUBMETIDOS À AUSÊNCIA DE CARGA

Nandressa Dayna Mendes Riso

Orientador: Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do titulo de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

ARAÇATUBA – SP

2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NANDRESSA DAYNA MENDES RISO – nascida em 28 de fevereiro de 1981, na cidade de Araçatuba – SP, formada em Fisioterapia pela Faculdade Salesiana de Lins, especialista em Fisioterapia Cardiorrespiratória pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp - campus de Presidente Prudente e aluna do curso de Pós-graduação em Ciência Animal da Unesp de Araçatuba.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque ele se tornará, assim, uma máquina utilizável, mas não uma personalidade.

É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que uma criatura harmoniosa e desenvolvida. Deve aprender a compreender, portanto, as motivações dos homens, suas quimeras e seu lugar exato em relação aos seus próximos e à comunidade”

Albert Einstein

Dedico este trabalho a Deus, a minha mãe e ao meu orientador Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada, alicerces nesta etapa sonhada e cumprida em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me fazer capaz de realizar meus sonhos, por ser meu pai, meu pão e minha luz.

Agradeço em especial ao principal responsável pela minha formação, meu orientador Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada. Obrigado pelo incentivo, orientação, doação, sabedoria e amizade. Uma pessoa fantástica que tive a honra de conhecer.

Agradeço,
A todos os meus familiares que me deram apoio, incentivo, abrigo e participaram das minhas angústias e anseios. A ausência foi grande, mas nunca maior do que meu amor por vocês.

Aos meus professores de graduação da Faculdade Salesiana de Lins, pela minha formação inicial.

Ao professor da especialização Dr. Luiz Carlos Marques Vanderley da FCT/Unesp pela confiança e pelo entusiasmo contagiante na arte de pesquisar e ensinar que tanto me estimulou.

Aos professores da Pós-graduação em Ciência Animal pelos ensinamentos transmitidos e por ter encontrado sempre as “portas abertas”.

À Dr^{a}. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini que aceitou a responsabilidade de me orientar na ausência do meu orientador. Obrigada pela presença constante e pelas sugestões valiosas no aprimoramento deste trabalho.

À prof[a] Dr[a] Vanda Jorgetti, da Faculdade de Medicina da USP, que mesmo sem me conhecer me acolheu em seu laboratório me ensinando a técnica de histomorfometria.

Ao Dr. Luiz Gustavo Nascimento Melo que não mediu esforços para ensinar todo o procedimento cirúrgico com muita paciência e amor.

Ao Tiago Augusto Ferrari por ter descoberto a iniciação científica por meio deste trabalho. Obrigada pelo incentivo, apoio, e presença em toda fase experimental.

Aos funcionários e técnicos da Unesp que transmitiram sua experiência e agradável convivência, em especial aos técnicos Pedro e Alexandre, as bibliotecárias e aos secretários Valéria e Diogo.

Aos colegas de mestrado palavras faltam para explicar o que todos significaram em minha vida, mas alguns ficarão no coração Rodrigo, Rodriguinho, Caio, Thiago, Alex, Cris, Gisele, Adriana, Flávia, Fabiana. Em especial, médico veterinário MSc. Bruno Monteiro da Silva cuja presença foi imprescindível em todas as cirurgias.

Aos amigos que esse mestrado me deu, amigos sempre presentes: Prof. Sérgio Diniz, prof. Wagner Pedro, prof. Luiz Eduardo Fonseca.

Aos diretores, funcionários e alunos da Faculdade de Saúde de São Paulo – FASSP, por acreditarem no meu trabalho e pela paciência.

Aos alunos do laboratório de biofísica (Cris, Juliana, Priscila, Bruna) que não mediram esforços para aprender, para me ajudar e me dar forças quando as minhas faltaram. Agradeço à Ft e MSc. Carolina Rubio Vicentini pelos ensinamentos transmitidos facilitando o meu caminhar.

A todos que de alguma maneira sonharam este sonho comigo e tiveram a oportunidade de vivê-lo, meus sinceros agradecimentos.

Com um sonho na mão e pessoas a sua volta de "bom coração" tudo dá certo!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS.....viii
LISTA DE FIGURAS.....ix
RESUMO.....xi
SUMARY.....x
I.INTRODUÇÃO.....1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....3
III. MATERIAL E MÉTODOS.....8
IV. RESULTADOS.....26
V. DISCUSSÃO.....39
VI. CONCLUSÃO 43
VII. REFERÊNCIAS.....44
APÊNDICES.....51
Apêndice A - Dados Relativos à Análise Densitométrica.....51
Apêndice B - Dados Relativos à Análise Histomorfométrica.....53
Apêndice C - Dados Estatísticos Relativos à Densitometria..... 57
Apêndice D - Dados Estatísticos Relativos à Histomorfometria.....59

LISTA DE ABREVIATURAS

As-Ga-Al	Arsento de Gálio-Alumínio
BV/TV	Bone Volume/Tissue Volume (Volume Ósseo/Volume Tecidual)
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
DMO	Densidade Mineral Óssea
ES/BS	Eroded Surface/Bone Surface (Superfície Erodida/Superfície Óssea)
He-Ne	Hélio-Neônio
LLLT	Low Level Laser Therapy (Terapia Laser de Baixa Potência)
N.Ob/T.Ar	Osteoblast Volume Density (Densidade de Volume de Osteoblastos)
N.Oc/T.Ar	Osteoclast Volume Density (Densidade de Volume de Osteoclastos)
Ob.S/BS	Osteoblast Surfacce/Bone Surface (Superfície de Osteoclastos/Superfície Óssea)
Oc.S/BS	Osteclast Surface/Bone Surface (Superfície de OSteoclastos/Superfície Óssea)
OS/BS	Osteóide Susface/Boné Surface (Superfície Osteóide/Superfície Óssea)
OV/BV	Osteoid Volume/Bone Volume (Volume Osteóide/Volume Ósseo)
T.Ar	Tissue Área (Área de Tecido)
Tb.N	Trabecular Number (Número de Trabéculas)
Tb.Sp	Trabecular Separation (Separação Trabecular)
Tb.Th	Trabecular Thickness (Espessura Trabecular)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Sistema de Fixação completo.....10
FIGURA 2. Desenho esquemático do rato suspenso pela cauda. 11
FIGURA 3. Animal na gaiola fixado ao eixo de suspensão, com os membros pélvicos sem contato com o solo.....13
FIGURA 4. Etapas do procedimento cirúrgico.....15
FIGURA 5. Esquema do tratamento com laser aplicado aos grupos experimentais.....16
FIGURA 6. Aplicação do laser no local da lesão.....17
FIGURA 7. Densitômetro ósseo utilizado nas análises.....18
FIGURA 8. Programa computacional utilizado para análise densitométrica (software LUNAR®).....18
FIGURA 9. imagem da tíbia de rato mostrada no equipamento DEXA.....19
FIGURA 10. Imagem da tíbia de rato mostrada no equipamento DEXA. Destaque para a área da osteotomia..... ...19
FIGURA 11. Modelo de fragmento ósseo envolto por bloco de metilmetacrilato para posterior análise histomorfométrica..... ..20
FIGURA 12. Finalização da peça para posterior microtomia.....21
FIGURA 13. Equipamento utilizado para a realização de cortes em tecidos duros - Micrótomo de impacto.....22
FIGURA 14. Bloco de metilmetacrilato no momento da realização do corte.....22
FIGURA 15. Modelos dos ossos envoltos por bloco de metilmetacrilato e lâminas preparadas para análise histomorfométricas.....23
FIGURA 16. Equipamento utilizado para análise histomorfométrica (microscópio acoplado a placa digitalizadora e software Osteomeasure®).....24
FIGURA 17 – Média da DMO do osso todo na tíbia D.....26

FIGURA 18 – Média da DMO do osso todo na tíbia esquerda.....27
FIGURA 19 – Média da DMO do osso todo.....27
FIGURA 20 – Média da DMO na região da osteotomia nos diferentes grupos.....29
FIGURA 21 – Exemplo dos resultados fornecidos pelo programa Osteomeasure®.....30
FIGURA 22 - Prancha com as imagens capturadas no programa computacional Osteomeasure®.....31
FIGURA 23 – Média da porcentagem de volume ósseo deste tecido observados nos três grupos experimentais.....32
Figura 24 – Média da separação trabecular óssea observados nos três grupos experimentais.....33
Figura 25 – Média do número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido observados nos três grupos experimentais.....33
Figura 26 – Média da proporção de volume osteóide/ volume ósseo observados nos três grupos experimentais.....34
Figura 27 – Média da proporção de superfície osteóide/ superfície óssea observados nos três grupos experimentais.....34
Figura 28 – Média da superfície de osteoblastos proporcional à superfície óssea analisada observados nos três grupos experimentais..35
Figura 29 – Média do número de osteoblastos por unidade de área de tecido observada nos três grupos experimentais.....35
Figura 30 – Média da superfície de reabsorção relativa à superfície óssea observados nos três grupos experimentais.....36
Figura 31 - Média da superfície de osteoclastos por unidade de superfície óssea observados nos três grupos experimentais.....37
Figura 32 – Média do número de osteoclastos por unidade de área de tecido observados nos três grupos experimentais.....37
Figura 33 – Média da espessura trabecular observadas nos três Grupos experimentais.....38

LASER TERAPÊUTICO NO REPARO ÓSSEO DE RATOS SUBMETIDOS À AUSÊNCIA DE CARGA.

RESUMO - Laser de baixa intensidade tem sido utilizado como agente físico em várias áreas das ciências médicas no reparo ósseo e tecidual. Entretanto pouco se sabe sobre seus efeitos em condições adversas como supressão de carga e osteopenia. Com a hipótese que o laser As-Ga-Al acelera o processo de consolidação óssea, foi objetivo deste estudo avaliar a densidade mineral óssea (DMO), e parâmetros histológicos em tíbias osteotomizadas de ratos Wistar, adultos, tratados com laser terapêutico de baixa intensidade em três diferentes grupos: G1 (n=10), referência 15 dias, osteotomizados, tratados com laser por 12 sessões e mantidos livres na gaiola; G2 (n=10), osteotomizados, suspenso pela cauda por 15 dias e tratados concomitantemente com Laser por 12 sessões; G3 (n=10), osteotomizados, suspenso pela cauda por 36 dias sendo que, após o 21º dia, iniciou-se tratamento com laser por 12 sessões, sendo a tíbia direita teste, irradiada com o laser e a esquerda controle. O laser utilizado foi de As-Ga-Al, DMC - Flash Lase III®, com comprimento de onda 830nm, 100 mW, 4J, 140 J/cm², 40s de aplicação em 12 sessões. Utilizou-se densitômetro DPX-Lunar®, com programa computacional para pequenos animais, e a análise comparativa foi feita em toda tíbia e na região da osteotomia. Análise histomorfométrica foi realizada com programa computacional Osteomesure®. Nossos resultados não demonstraram eficácia da terapia laser no processo de reparação óssea, o que discorda de muitos trabalhos. Uma possível explicação para estes resultados é que os efeitos da terapia laser de baixa potência possam ser manifestadas não só no local da irradiação como também a nível sistêmico.

Palavras Chaves: Densitometria óssea, Histomorfometria, Ratos, Simulação de ausência de peso, Terapia a Laser de Baixa Intensidade.

LASER TERAPÊUTICO NO REPARO ÓSSEO DE RATOS SUBMETIDOS À AUSÊNCIA DE CARGA.

SUMARY - Low-intensity laser has been used as a physical agent in various fields of medical sciences such as bone and tissue repair. Meanwhile little is known about its effects in adverse conditions such as abolition of load and osteopenic. With the assumption that the laser As-Ga-Al accelerates the process of consolidation bone, purpose of this study was to evaluate the bone mineral density - BMD, and histological parameters in tibia osteotomized of rats, adults, treated with laser of low intensity in three different groups: G1 (n = 10), reference 15 days, osteotomized, treated with laser for 12 sessions in the cage and kept free; G2 (n = 10), osteotomized, suspended by the tail for 15 days and treated concurrently with Laser for 12 sessions; G3 (n = 10), osteotomized, suspended by the tail by 36 days and, after the 21 th day, started up with laser treatment for 12 sessions, and the right tibia test, irradiated with the laser and left control. The laser was used to As-Ga-Al, DMC - Flash Lase ® III, with wavelength 830nm, 100 mW, 4J, 140 J / cm ², 40s of application in 12 sessions. It was used densitometer-Lunar DPX®, with computer program for "small animals", and the analysis was made in the bone throughout the region and the osteotomy. Histomorphometric analysis was performed with computer program Osteomesure®. Our results have not demonstrated effectiveness of laser therapy in the process of repairing bone, which disagrees with many works. One possible explanation for these results is that the effects of low-power laser therapy can be expressed not only in place of irradiation as well as systemic level.

Keywords: Bone densitometry, Histomorfometry, Mice, Weightlessness Simulation, the therapy of Low Intensity Laser.

I. INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, estima-se que a incidência anual de fraturas seja de um milhão de casos e destas 250 mil sejam de quadril e associadas à osteoporose (BRASIL, 2008).

No Brasil estima-se que exista uma população de 17,6 milhões de idosos e estima-se que até 2020 essa população poderá chegar até 40 milhões de pessoas (IBGE, 2000), classificando-se como a sexta maior parte da população de idosos no mundo. O crescimento dessa população em todo mundo indica que aumentará o custo para o tratamento das doenças crônicas degenerativas, entre essas a osteoporose destaca-se por sua elevada prevalência, bem como pelas fraturas por fragilidades decorrentes da deterioração da estrutura óssea (VALADARES, C. 2008).

Os custos para a pessoa idosa que cai e faz uma fratura são incalculáveis, atingindo toda a família na medida em que essa pessoa fraturada acaba hospitalizada e freqüentemente é submetida a tratamento cirúrgico. Para o sistema de saúde esse custeio também é elevado.

Como visto, o reparo ósseo ocorre mesmo em condições em que a ausência de carga está presente, como é o caso de pessoas ou animais que ficam com membros por um longo tempo imobilizados e acamados (VICENTINI et al., 2007).

Apesar dos crescentes avanços no tratamento de fraturas completas e incompletas, há ainda um desafio a comunidade cirúrgica e ortopédica, que pouco podem fazer para aumentar a velocidade de consolidação óssea, ainda mais quando temos osteopenia ou osteoporose associada à fratura, quadro bastante comum em idosos.

Várias intervenções físicas têm sido estudadas, como o laser terapêutico de baixa potência, cujo objetivo é reduzir a problemática associada às fraturas e ao alto custo socioeconômico por elas decorrente. Essas intervenções também são úteis em enfermidades que, por interferirem na manutenção da

massa óssea, acarretam um aumento da fragilidade óssea aumentando a incidência de fraturas, como acontece na osteoporose (CARVALHO et al., 2002).

Até o momento não há registros de estudos sobre os efeitos do laser em humanos e animais submetidos a ambiente de ausência de carga, tais como estação orbital, viagens espaciais, pacientes acamados e imobilizados, que possam desenvolver a osteopenia por desuso.

Tendo em vista esses fatores, métodos que auxiliem a consolidação de uma fratura são importantes por reduzirem custos, tempo de imobilização, tempo de hospitalização e permitirem um rápido retorno as atividades de vida diária.

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da terapia laser de baixa potência associada à ausência de carga no processo de reparo ósseo de tíbias de ratos osteotomizados, verificando sua influência nas propriedades estruturais e histológicas do osso por meio de análises densitométrica e histomorfométrica do tecido ósseo neoformado, em tíbias de ratos submetidos à osteotomias experimentais.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Tecido ósseo

O esqueleto é formado de tecido ósseo, que é um tipo mineralizado de natureza conjuntiva que se dispõe formando os ossos, estruturas resistentes e rígidas. Apesar do aspecto inerte, os ossos crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo. Quando lesados, como ocorre nas fraturas, são capazes de reparação, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade (KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

As células pertencentes ao tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são células cubóides e alongadas de origem mesenquimal que estão localizadas nas margens ósseas; sua função é produzir matriz orgânica do tecido ósseo. Em menor atividade estas células assumem uma forma mais delgada. Os osteócitos são osteoblastos encapsulados, que após a maturação ficaram presos dentro da matriz mineralizada, mas que ainda mantém contato com outras células através de ramificações do citoplasma, mantendo assim uma funcionalidade fisiológica do tecido (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999). Esse contato com células da superfície como os osteoblastos e "*lining cells*" está relacionado com a manutenção da estrutura óssea e com as respostas fisiológicas que levam à formação ou reabsorção do tecido (AUBIN et al., 2006).

Os osteoclastos são células gigantes, com múltiplos núcleos e sua função é relacionada à reabsorção. Em sinergia com os osteoblastos promovem a remodelação óssea.

Além disso, assim, como as outras, as células ósseas passam pelas etapas do ciclo celular, que compreendem desde a formação até a divisão celular (mitose). A mitose está susceptível às interferências externas, podendo a célula assumir um estado de repouso ou continuar a dividir-se ciclicamente (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

Fraturas e Consolidação

Quando um osso fratura acontece uma laceração do periósteo e pode também haver deslocamento dos fragmentos. Os vasos sanguíneos do osso e dos tecidos moles adjacentes se rompem, ocorrendo extravasamento de sangue e a formação de um coágulo dentro e ao redor do local fraturado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; MARINO, 2003).

Nos estágios Iniciais que duram de um a dois dias há evidências de uma reação inflamatória aguda. O coágulo sangüíneo atua como um arcabouço de fibrina o que facilita a migração de células de reparação. À medida que a resposta inflamatória regride temos a manifestação de uma intensa invasão celular e neovascularização, indicando que a osteogênese está ocorrendo no local. As células osteogênicas do periósteo e do endósteo proliferam-se em velocidades diferentes garantindo a formação de um anel conjuntivo denominado calo. O tecido ósseo imaturo é então progressivamente substituído por tecido ósseo maduro, completando com o restabelecendo do contorno original do osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; MARINO, 2003).

Como visto, o reparo ósseo consiste num processo regenerativo altamente complexo que envolve a repetição de eventos do desenvolvimento, incluindo a ação de diferentes tipos celulares, proteínas diversas e uma expressão genética ativa capaz de restaurar a integridade natural dos ossos. Conforme cita Lirani (2004), vários avanços biofísicos e biológicos surgiram para tentar minimizar o retardo de consolidação de fraturas e a pseudoartrose, alguns com resultados promissores.

Apesar dos crescentes avanços no tratamento de fraturas completas e incompletas, há ainda um desafio a comunidade cirúrgica e ortopédica, que pouco podem fazer para aumentar a velocidade de consolidação óssea, ainda mais quando temos osteopenia ou osteoporose associada à fratura, quadro bastante comum em idosos.

Para Cooper *et al.* (1992), as fraturas se tornaram um importante problema médico-social, pois elas interferem na qualidade e na expectativa de vida de suas vítimas, representando, ainda, um pesado ônus para o sistema de saúde.

Suspensão pela Cauda

Por questões éticas a maioria dos experimentos para simular ações de ausência de carga são realizados em animais, sendo o modelo de suspensão pela cauda um dos métodos atualmente utilizados por inúmeros autores (KASPER et al. 1993; MUSACHIA et al., 1983; SILVA 2002; VICENTINI et al., 2007).

O modelo de suspensão pela cauda ou modelo de hipocinesia tem sido executado desde a década de 60 e tenta simular as condições que acontecem em vôos espaciais podendo também ser utilizado para simular pacientes acamados e imobilizados. Embora o método produza condições diferentes da imobilização (os animais podem realizar contrações dinâmicas, porém com carga mínima) as alterações podem ser observadas no sistema músculo-esquelético de acordo com o tempo de exposição a essa situação (MATSUMOTO et al., 1998).

Em Medicina Veterinária, o emprego deste modelo seria útil na tentativa de entender o processo de consolidação óssea em animais traumatizados em membros pélvicos, que permanecem imobilizados e sofrem alterações da microarquitetura óssea (VICENTINI et al. 2007).

Essa condição gera uma baixa tensão sobre os ossos e, por conseqüência, menor massa óssea será necessária para manter a integridade estrutural do esqueleto (JONHSON, 1998).

Portanto, uma vez que os ossos são sensíveis a tensões mecânicas, a estrutura óssea pode ser modificada com alterações de gravidade ou ausência de contato com o solo (COWIN, 1998).

Laser

Métodos físicos capazes de estimular a consolidação de fratura, acelerando a osteointegração ou osteogênese são de considerável importância para a prática médica e odontológica (GIORDANO et al., 2001).

Como cita Lirani (2004) em seus estudos, o estímulo do incremento ósseo tem sido obtido por meio da terapia com laser de baixa potência. Apesar dos avanços demonstrados para resolver tal questão, poucos agentes físicos existentes tem demonstrado aplicação clínica rotineira.

O laser de baixa potência surgiu como uma nova opção, sendo hoje considerado um método terapêutico alternativo, tendo evoluído de maneira extraordinária em decorrência dos diversos trabalhos científicos e da divulgação de seus principais efeitos terapêuticos, entre eles fotobiomodulação em tecidos biológicos.

Esse agente físico vem demonstrando efeitos positivos na proliferação de células ósseas e no processo de consolidação de fraturas em animais (KARU, 1995). Ele tem sido utilizado desde 1960 por seus efeitos terapêuticos no tratamento de uma série de condições patológicas de diversos tecidos, incluindo o tecido nervoso, o tecido muscular, tendões, cartilagem e outros. Foi observado que o laser promove a reabsorção de exudatos, a síntese e remodelação de colágeno, aumento no número de fibroblastos, aumento da viabilidade dos enxertos (BASFORD, 1989).

No tecido ósseo o laser de baixa potência é capaz de produzir um aumento da proliferação de osteoblastos, aumento de osteoclastos, aumento da síntese de DNA, aumento das concentrações de fosfatase alcalina, aumento da velocidade de reorganização da estrutura trabecular e canais haversianos (BARUSHKA, et al., 1995; FREITAS et al., 2000; GARAVELLO et al., 2003; KIM et al., 1996; LUGER et al., 1998; MESTER et al., 1985; STEIN et al., 2005; TANG; CHAI, 1986; TRELLES; MAYAIO, 1987).

O objetivo do tratamento com laser é ativar a microcirculação e promover melhora do sistema imunológico e dos processos proliferativos (TUNER e HODE, 2004). De acordo com Mikail e Pedro (2006), a utilização do laser logo após a cirurgia, ou seja, no período de maior trabalho celular, contribui significativamente para acelerar o processo de cicatrização óssea, com aplicações diárias sobre o foco da fratura, em toda sua extensão, com intensidade variando de acordo com a espessura do osso.

Estudos sugerem que o laser também apresenta efeitos sistêmicos, por meio de mediadores metabólicos liberados na circulação, atingindo áreas distantes do local de aplicação (OHSHIRO, 1991; MARINO, 2003). Segundo Mikail e Pedro (2006), quando irradiada a corrente sangüínea visando o tratamento de áreas distantes ao local em que foi aplicado, com comprimentos de onda entre 633 e 890 nm, o efeito sistêmico é atingido. Porém esse efeito ainda é controverso.

Até o momento, ainda de acordo com Lirani (2004), a maioria dos estudos realizados “in vivo” utilizando o laser em tecido ósseo é qualitativa e para que seja comprovada sua eficácia, quanto ao aumento da remodelação, estudos quantitativos devem ser realizados.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal adotado pelo COBEA, tendo sido aprovado pela comissão de ética na experimentação animal (CEEA) com o protocolo nº 24/06.

Animais Experimentais

Utilizou-se 30 ratos, machos, adultos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça Wistar, de massa corporal média (395 ± 36 g), provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP / Campus de Araçatuba - SP. Estes permaneceram no laboratório de Biofísica da mesma Universidade, em gaiolas de polipropileno padrão, agrupados em número de três a quatro animais, mantidos em ambiente higienizado com iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água, ração balanceada *ad libidum* e em local de acesso restrito.

Grupos Experimentais

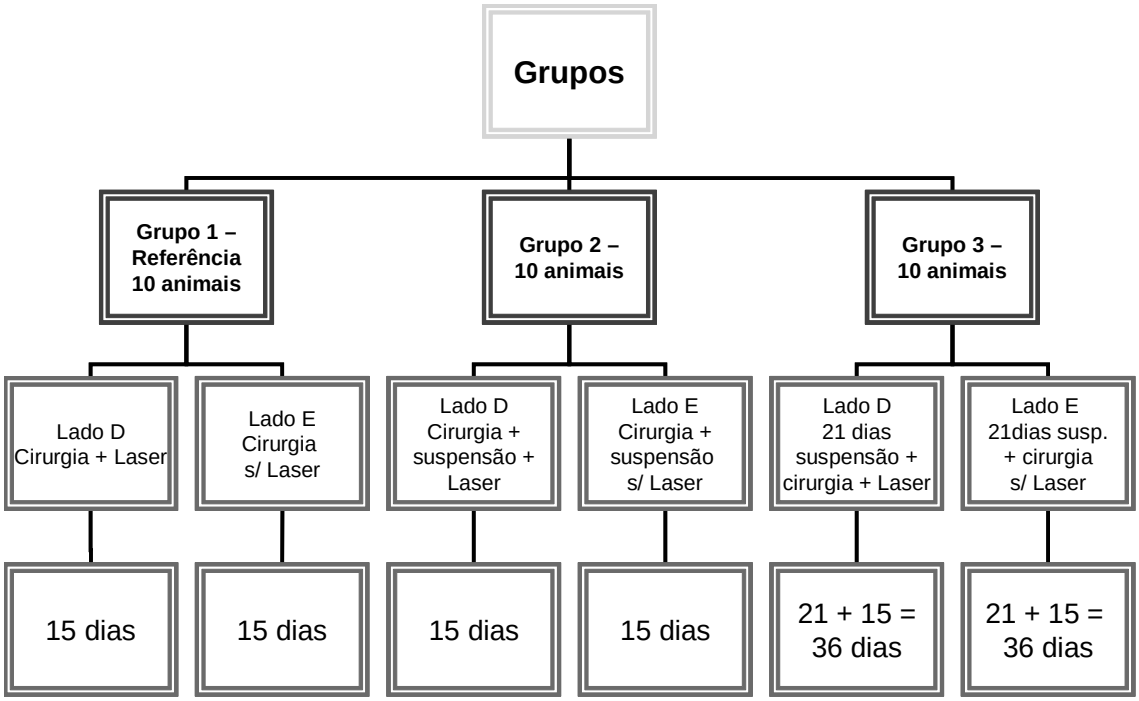
Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos:

G1 – Referência: ratos osteotomizados e mantidos livres na gaiola por 15 dias.

G2 – Ratos osteotomizados e submetidos à ausência de carga por 15 dias.

G3 – Ratos osteopênicos osteotomizados e submetidos a ausência de carga por 15 dias.

DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS



Técnica de Suspensão

Os animais dos grupos 2 e 3 foram suspensos pela cauda, e todos os procedimentos para suspensão foram baseados no trabalho de Vicentini *et al.* (2007) com as seguintes adaptações:

- lavagem da cauda com sabonete líquido antisséptico
- substituição da tintura de Benjoin por iodopovedine tópico

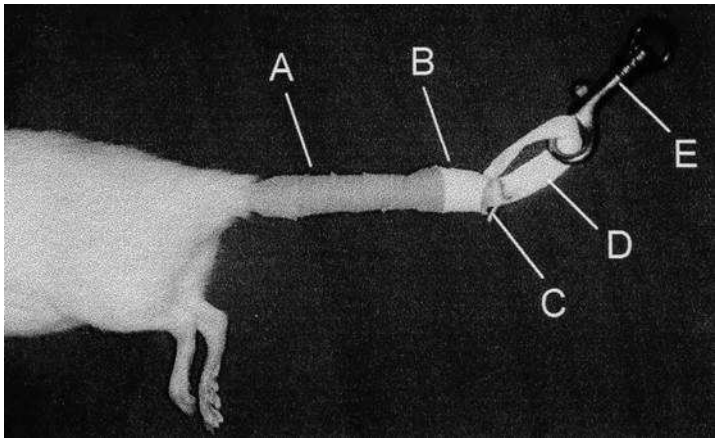
A modificação na realização do protocolo de suspensão pela cauda mostrou-se eficaz e capaz de prevenir danos ao animal causados pelo próprio modelo experimental.

Preparo do Animal

Para a preparação da cauda no processo de instalação da suspensão, os animais do grupo 3 foram anestesiados com uma aplicação intramuscular de ketamina e xilazina na proporção de 30 mg/kg e 3 mg/kg respectivamente, os animais dos grupos 1 e 2 já estavam anestesiados para a cirurgia da tíbia.

Sob anestesia, a cauda do animal foi lavada com água e sabonete líquido anti-séptico e, após seca, feita a anti-sepsia com iodopovedine por toda a pele. Em seguida, a cauda foi envolvida por espuma adesiva (Reston®) desde sua origem até os dois terços proximais, com o objetivo de proteger a pele e evitar futuras lesões cutâneas.

Sobre a espuma adesiva foi aplicada uma bandagem elástica denominada Coban®(modelo 1582 da marca 3M®) que foi tensionada homogeneamente envolvendo toda a espuma. Sobre o envoltório da tira elástica foi colocada uma fita de cadarço sarjado que foi fixado por enfaixamentos adicionais de bandagem elástica e de esparadrapo, de modo a formar uma alça que serviu para conectar o animal ao sistema de suspensão por meio de uma presilha metálica.



A – Cauda do animal envolvida com espuma adesiva e bandagem
B – Esparadrapo
C – Barbante
D – Cadarço sarjado
E – Presilha

FIGURA 1 – Sistema de Fixação completa. **FONTE**: SILVA, A.V. **Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato**. Ribeirão Preto. Tese de Mestrado-Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. 2002.

Após os procedimentos de preparação da cauda foi aplicado Banamine® (analgésico, antiinflamatório e antitérmico) subcutâneo na dose de 2,5 mg/kg. Esta aplicação foi realizada a cada 12 horas por um período de três dias consecutivos.

Sistema de Suspensão

O sistema de suspensão foi semelhante ao utilizado por Vicentini et al. (2007), constituído por uma gaiola comum, única, onde foi instalado o sistema de fixação e suspensão do animal. A estrutura da gaiola permitiu aos animais livre movimentação com os membros dianteiros, mantendo os membros pélvicos suspensos sem apoio no piso da gaiola ou nas paredes laterais, mantendo o animal, visualmente inclinado aproximadamente 30 graus em relação ao assoalho.

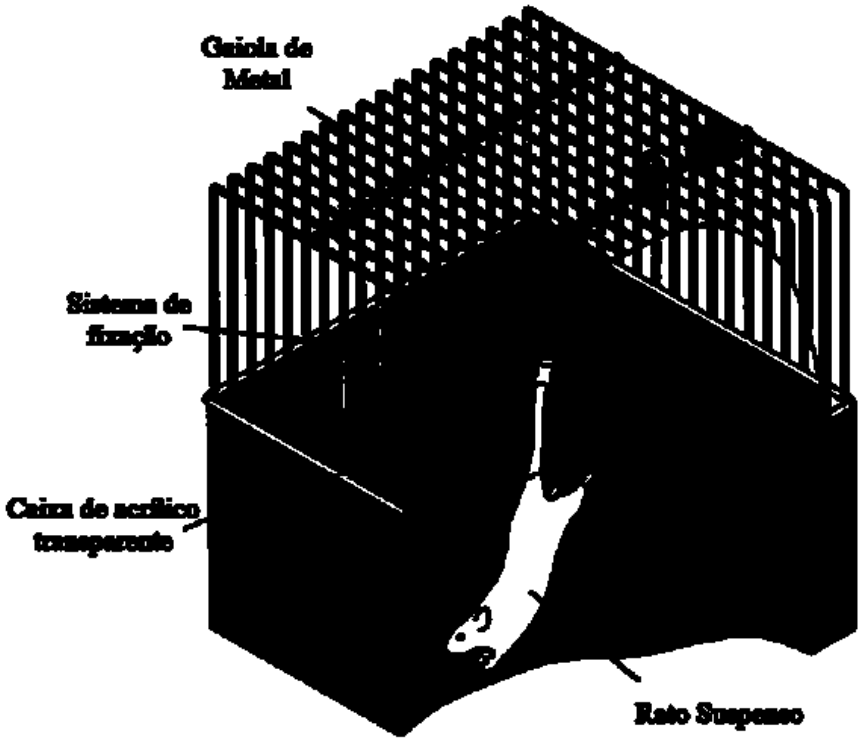


FIGURA 2. Desenho esquemático do rato suspenso pela cauda. **FONTE**: SHIMANO, M.M. **Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos após período de suspensão pela cauda e exercitação.odelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato**. Ribeirão Preto. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.

O sistema de fixação foi composto por:

- Uma presilha que serviu de encaixe da alça que fez parte do sistema de acoplamento do animal;

- Haste rosqueada de aço retilínea com 40 cm de comprimento e 4,5 mm de diâmetro;
- Arruelas presa por duas porcas próximas à presilha, para delimitar o espaço de movimentação do animal no interior da gaiola, sendo que o limite de curso para movimentação foi de 5 cm.
- Porcas sextavadas;
- Porcas borboleta e arruelas para fixação da haste na grade da gaiola;

Esta haste foi colocada transversalmente na região superior da gaiola, a alça da cauda do animal foi presa na presilha do sistema de suspensão e logo após, regulada a altura do animal para que seus membros pélvicos ficassem totalmente suspensos. Após esta verificação a haste foi então fixada na grade pelas porcas borboletas.

No assoalho da gaiola foi colocado ração e maravalhas. A higienização foi realizada a cada 3 dias com a substituição da maravalha.

Os animais tiveram acesso a água e a ração balanceadas (Rações e Concentrados Primor®) "*ad libidum*" e puderam se movimentar.

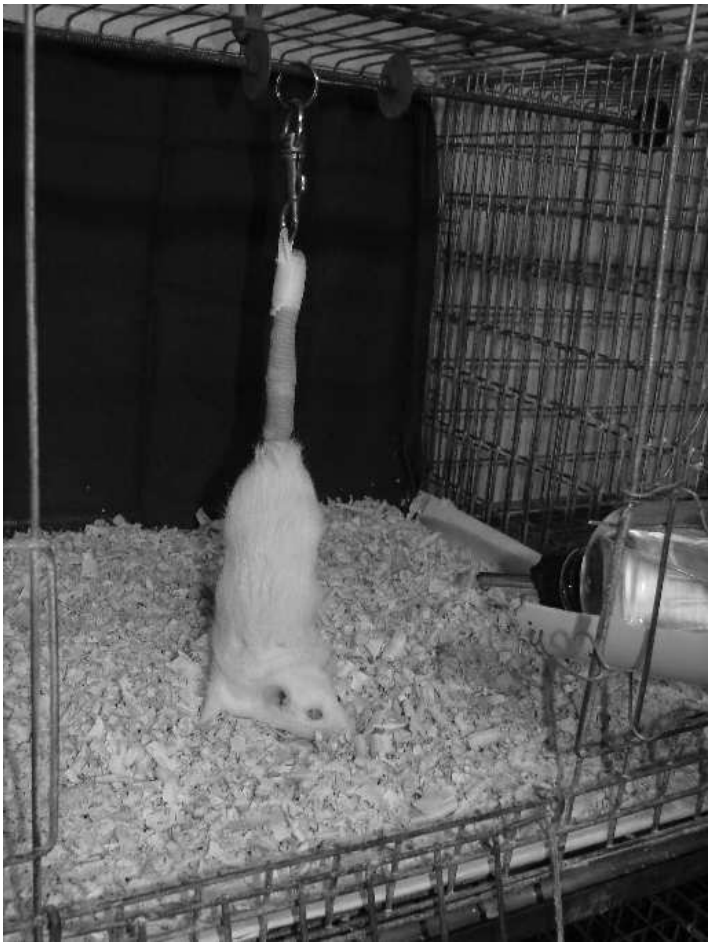


FIGURA 3. Animal na gaiola fixado ao eixo de suspensão, com os membros pélvicos sem contato com o solo.

Procedimento Experimental

Cirurgia

Todas as cirurgias foram realizadas de acordo com as normas para a prática didático-científica da vivisecção de animais (lei 6638/08 de maio de 1979) e com os princípios éticos na experimentação animal (COBEA, 1991) sob condições padrão de assepsia e sob anestesia geral.

Os animais foram pesados e anestesiados com uma combinação de ketamina e xilazina 100 mg/Kg e 10 mg/Kg aplicados intraperitonealmente. Em seguida, foi realizada a tricotomia mecânica dos pelos sobre a superfície ântero-medial do membro pélvico direito e esquerdo. Na seqüência, os animais

foram mantidos permanentemente na posição supino, com ambos os membros em rotação externa de quadril e tríplice flexão (quadril/joelho/tornozelo). A anti-sepsia da região direita foi realizada com iodopovedine.

Após a anti-sepsia, foi realizada uma incisão linear no sentido longitudinal do membro posterior, sobre a pele, fáscia miotendínea e músculos estendendo-se até o periósteo da mesma. O músculos e o periósteo foram afastados no sentido látero-lateral com uma espátula, para permitir o acesso à tíbia. Só então, ambas as tíbias foram osteotomizadas cirurgicamente na região diafisária, utilizando-se uma broca de uso odontológico, de aço comum para contra-ângulo, cilíndrica, de 22 mm de comprimento, nº6, acoplada a motor de baixa rotação.

O defeito ósseo foi criado com a broca mantida na posição horizontal e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, passando pela cortical, danificando o canal medular, ou seja, atigindo o endósteo, mas sem romper a outra cortical na face contralateral, promovendo-se ao final um defeito de 4x2 mm. Durante todo o período de realização da osteotomia, a tíbia foi irrigada com soro fisiológico.

Finalizando, o tecido muscular foi suturado com fio reabsorvível Vycril 4-0 (Johnson e Johnson®) e a pele foi suturada com fio de seda montado em agulha 4-0 (Johnson e Johnson®) ambos com suturas interrompidas simples. Feito a limpeza local com iodopovedine.

No pós-operatório os animais receberam uma dose de 2,5mg/kg de Banamine® via subcutânea a cada doze horas por um período de três dias.

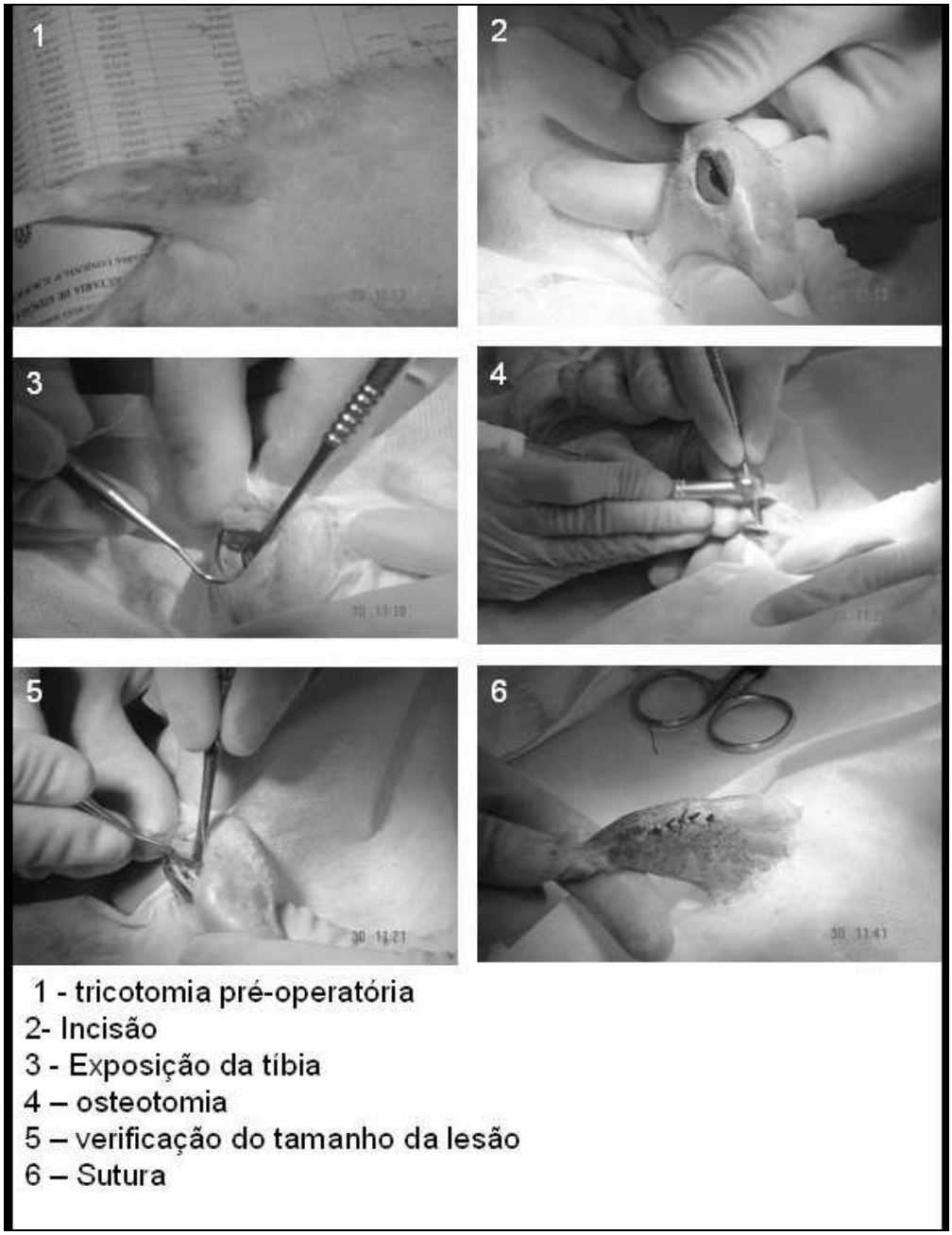


FIGURA 4. Etapas do procedimento cirúrgico.

Tratamento com Laser

Apenas a tíbia direita dos animais pertencentes aos três grupos foi tratada com LLLT. O aparelho utilizado foi um modelo portátil de Laser DMC®, Ga-Al-As, com comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída

de 100 mW, dose de 4J, fluência de 140 J/cm², com tempo de aplicação de 40 segundos em 12 sessões. As tíbias do lado esquerdo serviram de controle.

A aplicação de laser iniciou-se no primeiro dia após a cirurgia, totalizando 12 sessões. As aplicações foram executadas de forma padronizada a cada 24 horas, com intervalo de um dia após seis sessões consecutivas, como mostra a FIGURA 5.

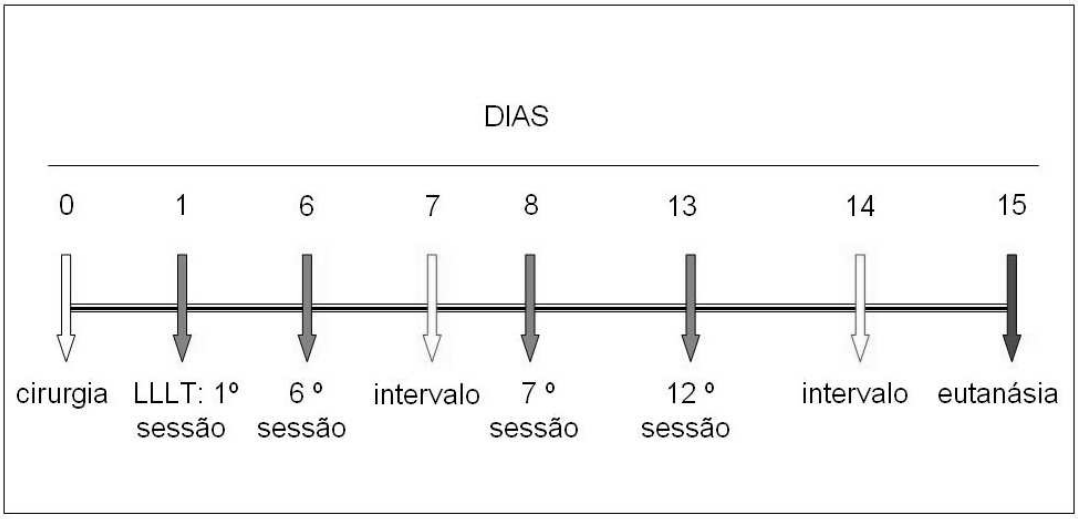


FIGURA 5. Esquema do tratamento com laser aplicado aos grupos experimentais.

Para a realização das irradiações os animais foram contidos e as irradiações foram realizadas por meio da técnica puntual, fotoestimulando dois pontos localizados na região da incisão cirúrgica, correspondente a região da lesão.

FIGURA 6. Aplicação do laser no local da lesão.

No 16º dia pós-operatório, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de pentobarbital sódico (100 mg/kg) via intravenosa e tiveram ambas as tíbias desarticuladas e dissecadas para posterior análise densitométrica.

Análise Densitométrica

As tíbias foram desarticuladas, dissecadas, identificadas e no mesmo dia do sacrifício realizadas as análises densitométricas por absorciometria de raios X de dupla energia (DEXA) utilizando-se densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR[1], com um programa especial para pequenos animais, com alta resolução.

Os ossos foram submersos em um recipiente plástico contendo água a 2 cm de profundidade (para simular tecido mole), alinhados corretamente e em seguida escaneado como um todo, capturando sua imagem.

Posteriormente, as imagens foram analisadas e obteve-se os valores de área, conteúdo mineral ósseo (CMO) e densidade mineral óssea (DMO). A densidade mineral óssea, obtida em g/cm^2, foi medida em toda a tíbia e, mais especificamente no terço médio, abrangendo o ponto mais proximal da fratura.

 LUNAR™, processo Fapesp n. 04/13264-7

FIGURA 7. Densitômetro ósseo utilizado nas análises.

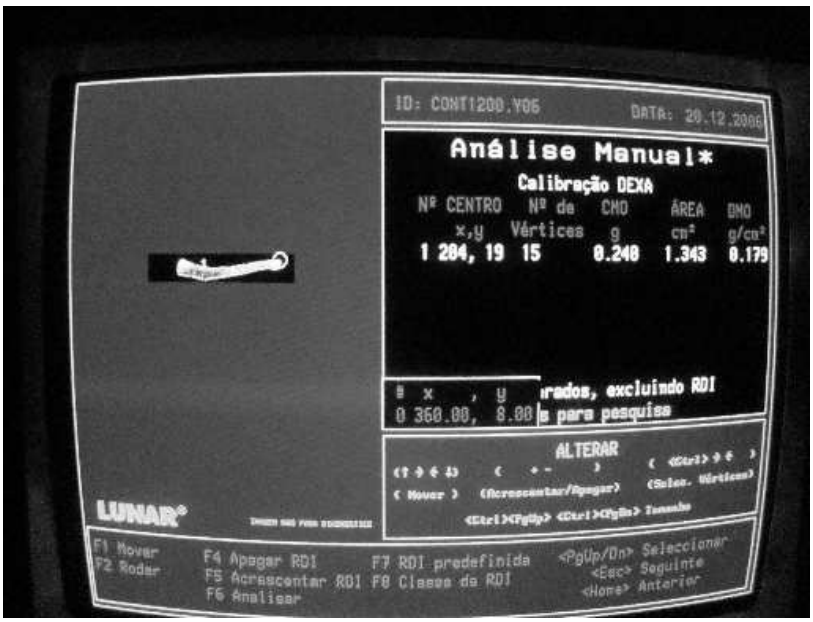


FIGURA 8. Programa computacional utilizado para análise densitométrica (software LUNAR®).

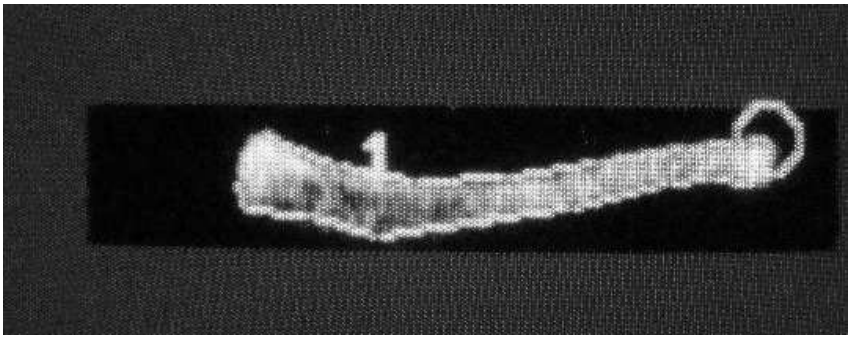


FIGURA 9. Imagem da tíbia de rato mostrada no equipamento DEXA.

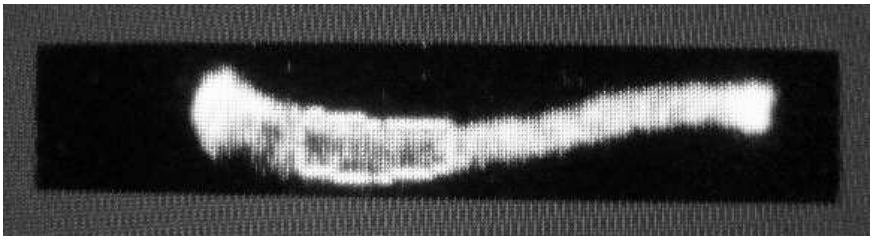


FIGURA 10. Imagem da tíbia de rato mostrada no equipamento DEXA. Destaque para a área da osteotomia.

Técnica Histológica

Após a realização da densitometria os ossos foram cortados 1 cm abaixo da lesão. Em seguida, foram submetidos ao protocolo para histologia de tecido ósseo calcificado do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da USP/SP, para a obtenção de lâminas e posterior análise histomorfométrica, passando pelas seguintes etapas de processamento:

1º) FIXAÇÃO

Fixar a amostra óssea em Etanol a 70% por 7 dias (4℃).

2º) DESIDRATAÇÃO

Em Etanol Absoluto (100%) por 7 dias (4℃).

3º) TOLUENO

Permanência por 1 dia a 4℃.

4º) PENETRAÇÃO PELA RESINA (4℃):

- De 3 a 5 dias em Solução A: 25% de Dibutilftalato e 75% de Metilmetacrilato - estocado em geladeira (100ml)
- De 3 a 5 dias em Solução 1 % : Solução A (100ml) e 1 g de Peróxido de Benzoíla
- De 3 a 5 dias em Solução 2 %: Solução A (100ml) e 2 g de Peróxido de Benzoíla

5º) INCLUSÃO

A inclusão foi realizada numa "pré-base", ou seja, num frasco de vidro de 20 ml com tampa, com cerca de 5 ml de Solução 2 % já polimerizada em estufa à 37ºC. O material foi adicionado sobre esta "pré-base" com subseqüente preenchimento do frasco a seguir com mais 10 ml de Solução 2 %, ficando desta maneira imerso o fragmento. O frasco foi levado novamente a estufa a 37ºC por cerca de 48 horas para polimerização da solução 2% adicionada.

6º) PREPARAÇÃO DO BLOCO

O frasco de 20 ml onde foi feita a inclusão serviu somente como molde, desta maneira o mesmo foi quebrado.

FIGURA 11. Modelo de fragmento ósseo envolto por bloco de metilmetacrilato para posterior análise histomorfométrica.

Após a remoção do vidro foi confeccionado um bloco retangular com auxílio de uma serra, seguindo de lixamento com lixa d'água e identificação. Neste momento o bloco estava pronto para a microtomia.

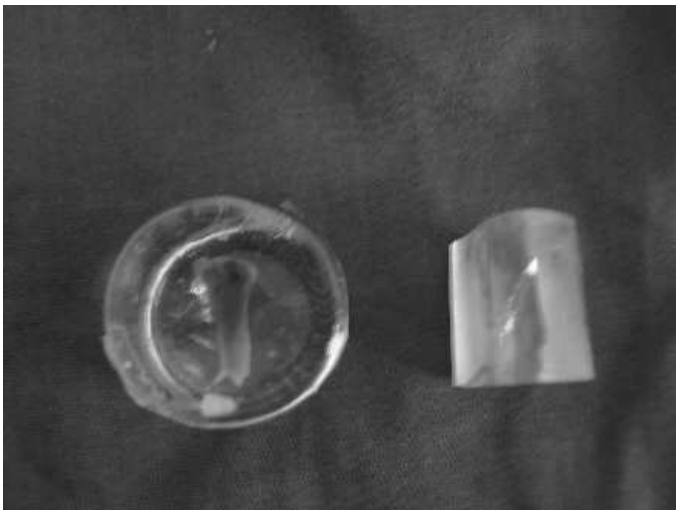


FIGURA 12. Finalização da peça para posterior microtomia.

7º) MICROTOMIA

O bloco foi fixado em micrótomo de impacto com navalha de tungstênio tipo D (modelo JUNG Policut S, Leica). De cada bloco foram obtidos 4 cortes histológicos de 5 µm para coloração (parâmetros estáticos).

Os cortes foram colocados em lâminas gelatinadas e esticados com auxílio de pincel embebido em álcool 50% e 100%.

Após a microtomia, as lâminas foram colocadas em estufa a 37ºC por cerca de 12 horas.

FIGURA 13. Equipamento utilizado para a realização de cortes em tecidos duros - Micrótomo de impacto.

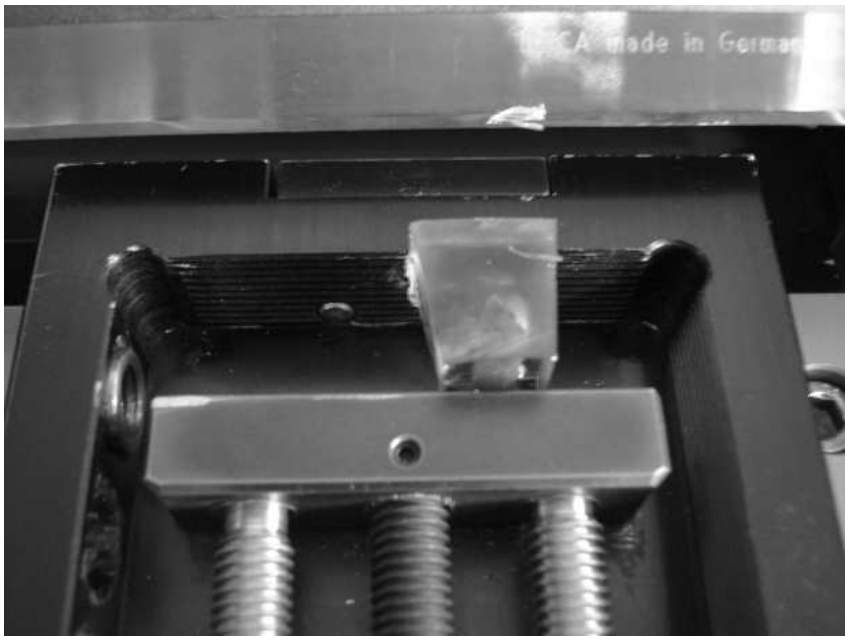


FIGURA 14. Bloco de metilmetacrilato no momento da realização do corte.

8º) DESPLASTIFICAÇÃO

Os cortes foram desplastificados em Metilmetacrilato puro por 20-40 minutos (na dependência do tempo de utilização do metilmetacrilato). Após a desplastificação as lâminas foram desidratados em Etanol 100% e reidratados em Etanol 50% e por fim água destilada.

9º) COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA

A partir deste estágio, as lâminas desplastificadas foram coradas com Azul de Toluidina 0,1% por cerca de 10 minutos. Após a coloração, as lâminas foram secadas cuidadosamente com lenço de papel, passadas no álcool butílico e clareadas em Tolueno.

Feita a montagem, todas as lâminas foram avaliadas superficialmente em microscópio para verificar a necessidade ou não de novos cortes, mediante coloração inadequada ou presença de artefatos em excesso.

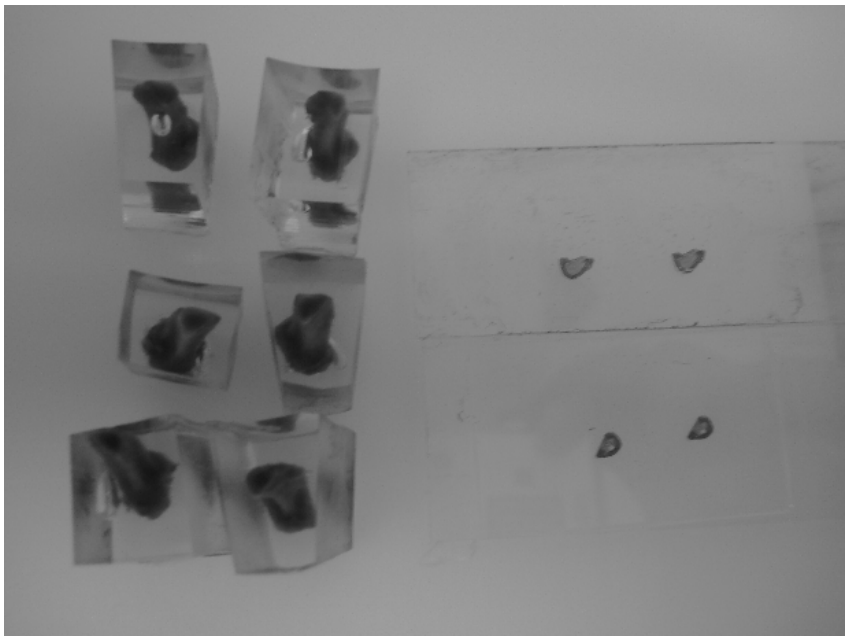


FIGURA 15. Modelos dos ossos envoltos por bloco de metilmetacrilato e lâminas preparadas para análise histomorfométricas.

Análise Histomorfométrica

As análises foram realizadas no microscópio Labophot 2A Nikon, placa digitalizadora e programa Osteomeasure® (Osteometrics, Inc.).

Localizada a região em reparo, foram analisados os campos de osso trabecular encontrados logo abaixo da cortical.

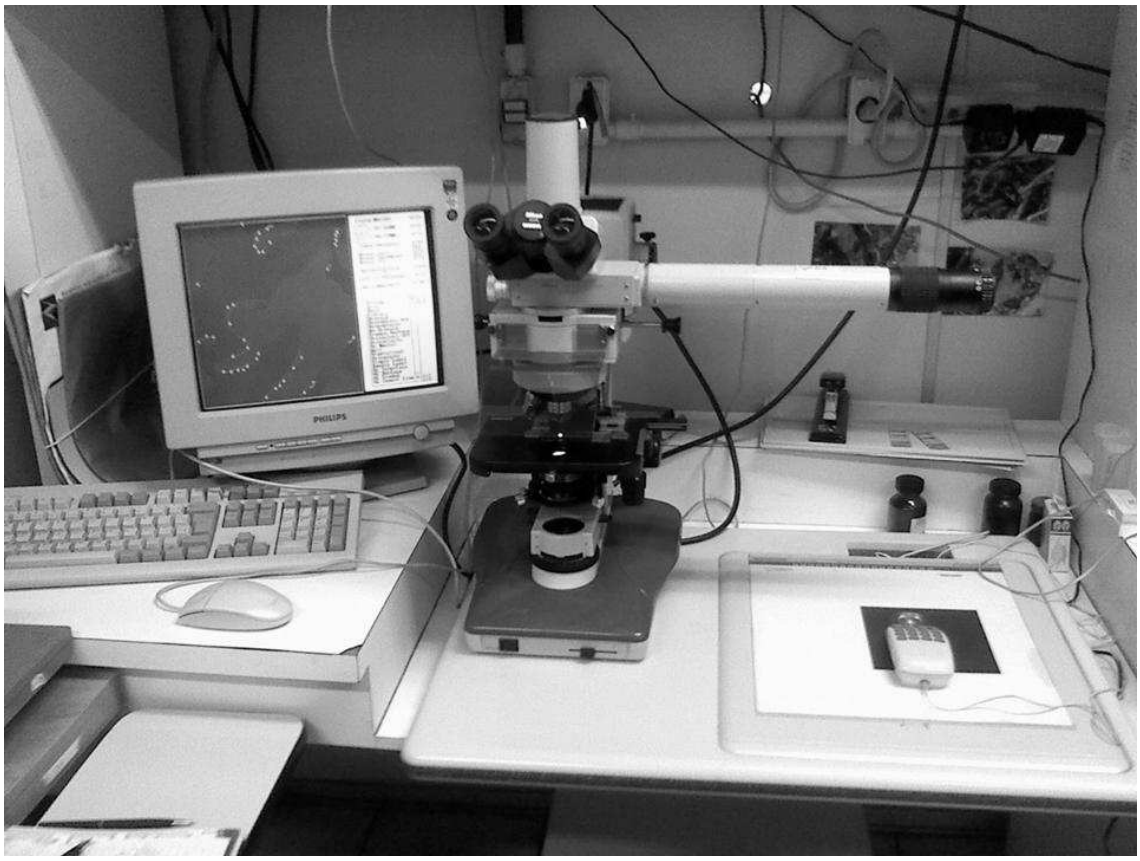


FIGURA 16. Equipamento utilizado para análise histomorfométrica (microscópio acoplado a placa digitalizadora e software Osteomeasure®).

Foi realizada a mensuração dos parâmetros histomorfométricos estáticos e seguiram a nomeclatura padronizada pela "American *Society of Bone and Mineral Research"* (PARFITT et al., 1987) traduzida para o português com exceção das abreviações, que incluem:

1. BV/TV (%): Volume ósseo trabecular como porcentagem do volume tecidual

2. Tb.Sp (µm): Distância entre trabéculas
3. Tb.N (mm): Número de trabéculas por milímetro de tecido
4. OV/BV (%): Volume osteóide como porcentagem do volume ósseo
5. OS/BS (%): Superfície osteóide como porcentagem da superfície óssea
6. Ob.S/BS (%): Superfície de osteoblastos como porcentagem da superfície óssea
7. N.Ob/T.Ar.: Número de osteoblastos por área de tecido
8. ES/BS (%): Superfície de reabsorção como porcentagem da superfície óssea
9. Oc.S/BS (%):Superfície de osteoclastos como porcentagem da superfície óssea
10. N.Oc/T.Ar: Número de Osteoclastos por área do tecido
11. Tb.Th (µm): Espessura trabecular

A análise histomorfométrica foi realizada às cegas e com a supervisão da responsável pelo Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da USP/São Paulo.

Análise Estatística

Os dados obtidos na densitometria e histomorfometria óssea foram analisados estatisticamente com o programa *GraphPAd Instat*® utilizando-se a análise de variância (ANOVA) para comparação simultânea dos grupos. A análise de *Tukey-Kramer* foi utilizada para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos precisando o nível de significância.

O nível de significância utilizado foi de 5% em todas as análises ($p \leq 0,05$).

IV. RESULTADOS

Resultados da Densidade Mineral Óssea

Os dados relativos à análise densitométrica bem como a estatística do mesmo podem ser encontrados respectivamente nos Apêndices A e C.

Osso Todo

Quando analisado o osso todo, a média da DMO obtida nos membros irradiados está representada na FIGURA 17. Para os membros que não receberam laser, a média da DMO está representada na FIGURA 18. A comparação simultânea das médias da DMO pode ser observada na FIGURA 19.

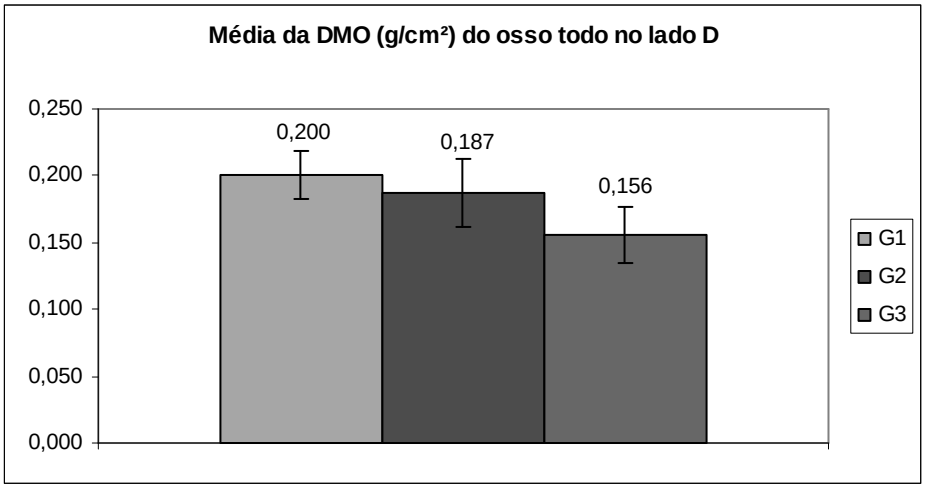


FIGURA 17 – Média da DMO do osso todo na tíbia D.

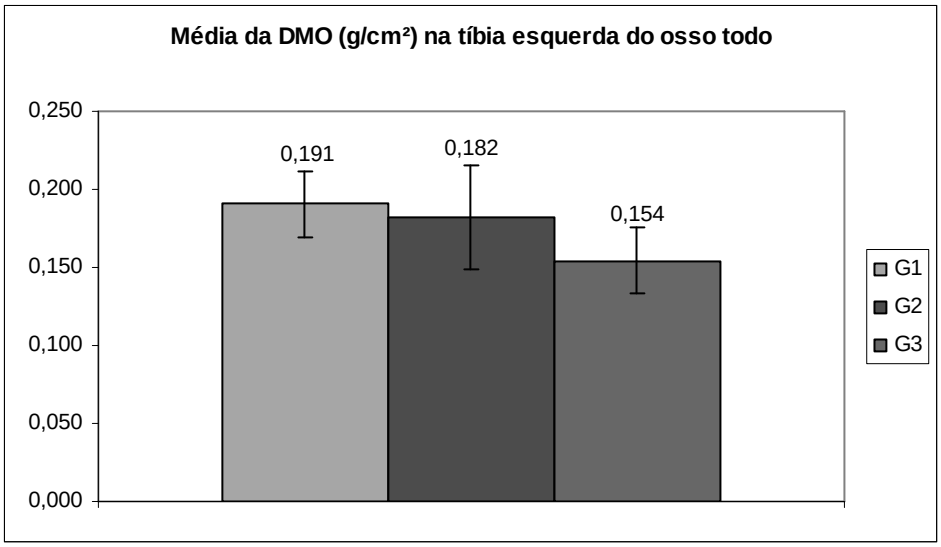


FIGURA 18 – Média da DMO do osso todo na tíbia esquerda.

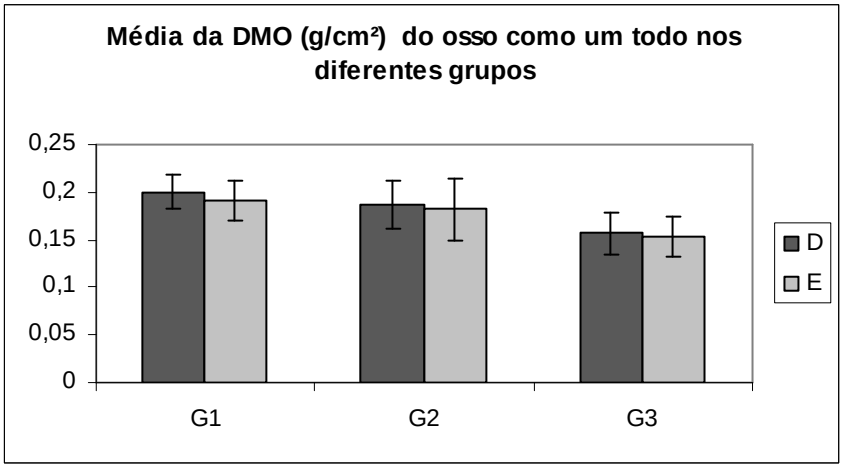


FIGURA 19 – Média da DMO do osso todo.

Através da análise estatística foi possível comparar os diferentes grupos experimentais. A análise densitométrica do osso como um todo está representada na Tabela 1 e mostra que o objetivo de se induzir a osteopenia foi alcançado, tendo de acordo com cada período de suspensão uma alteração decrescente da densidade mineral óssea.

Tabela 1 - Valores da média e desvio padrão da DMO (g/cm²) observadas no osso todo de ratos nos diferentes grupos.

Grupos	DMO	
	D	E
G1	0,200 ± 0,018[a]	0,191 ± 0,021[a]
G2	0,187 ± 0,026	0,182 ± 0,033[a,c]
G3	0,156 ± 0,022[b]	0,154 ± 0,021[b,c]

Valores na mesma linha e coluna seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

A DMO obtida nas amostras das tíbias tratadas no grupo 1 mostrou-se significativamente maior que ambas as tíbias do grupo 3, com nível de significância p < 0,01. Semelhantemente, quando comparadas as amostras das tíbias não tratadas do grupo 1 com ambas as tíbias do grupo 3 observou-se que para o primeiro houve uma diferença significativamente maior, com nível de significância p < 0,05, mas ambas foram significantes.

As tíbias não tratadas do grupo 2 também apresentaram DMO significativamente maior que no grupo 3 que recebeu tratamento com laser.

Região da Osteotomia

A DMO analisada foi muito semelhante nos grupos estudados conforme mostra a Tabela 2, não apresentando diferenças estatísticas significativas (p=0,06880) (FIGURA 20).

Tabela 2 - Valores da média e desvio padrão da DMO (g/cm²) observadas na região do defeito ósseo de ratos nos diferentes grupos.

Grupos	DMO	
	D	E
G1	0,164 ± 0,012	0,155 ± 0,018
G2	0,164 ± 0,024	0,164 ± 0,033
G3	0,150 ± 0,028	0,153 ± 0,029

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e lados (ANOVA - Tukey (P>0,05)).

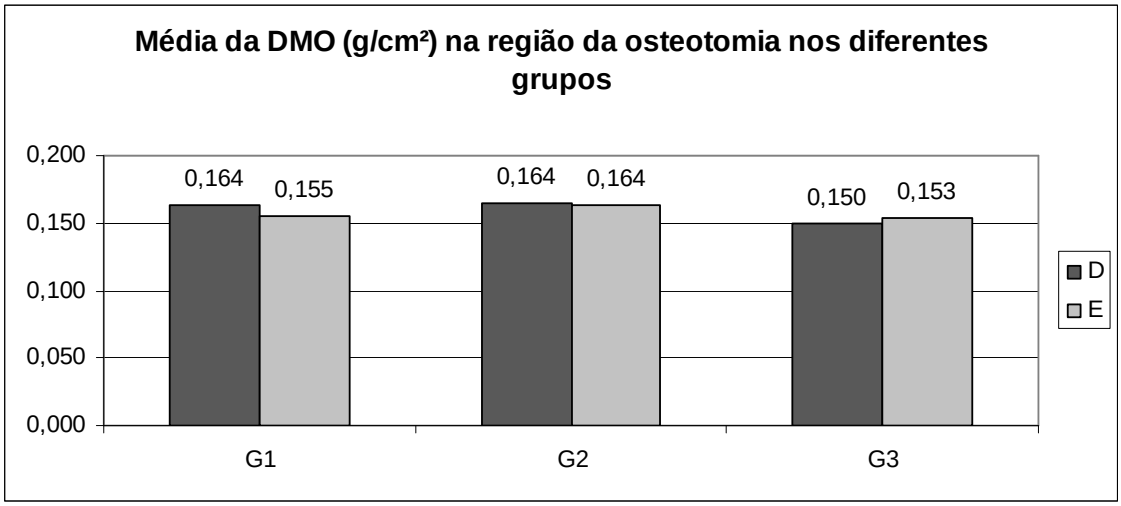
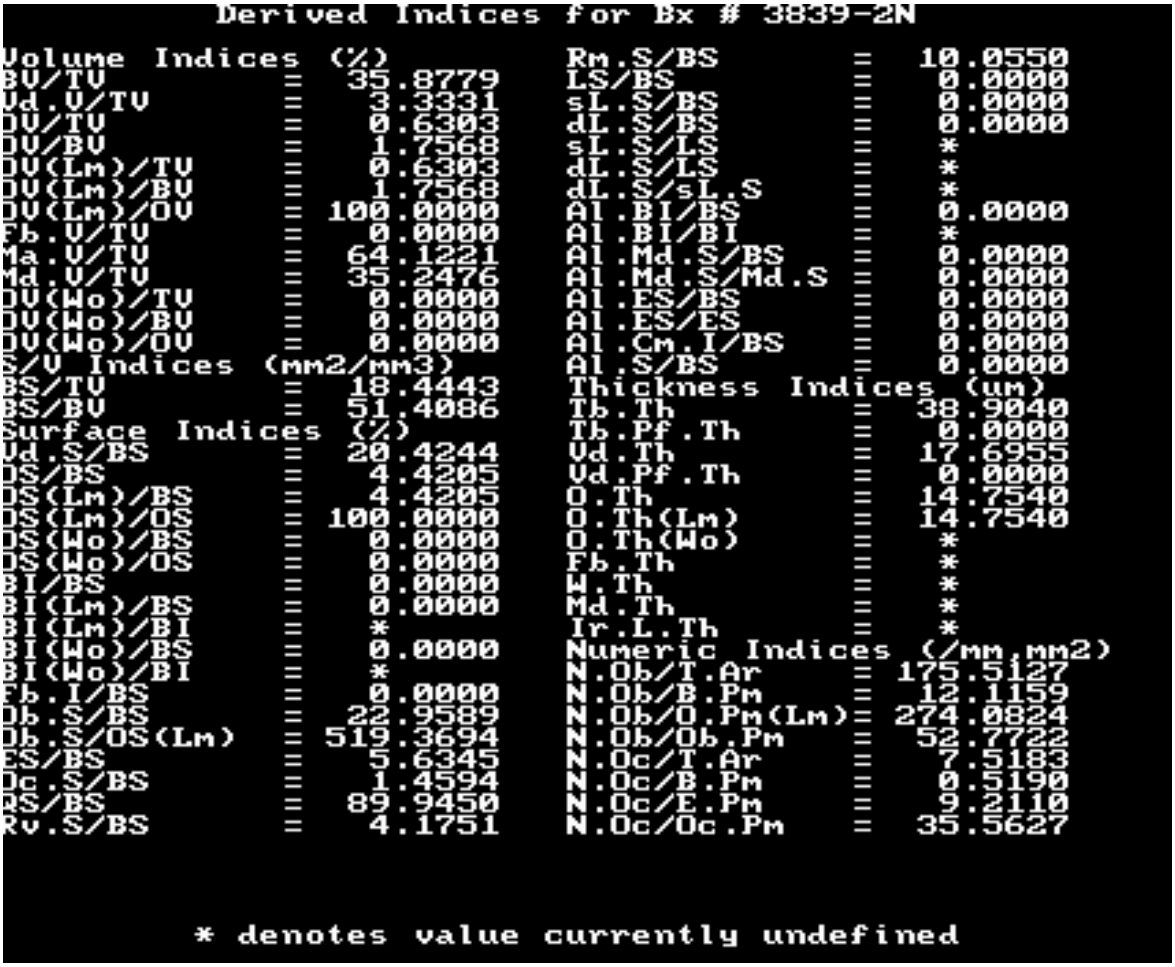


FIGURA 20 – Média da DMO na região da osteotomia nos diferentes grupos.

Resultados da Histomorfometria Óssea

A análise histomorfométrica das lâminas histológicas dos grupos 1, 2 e 3 (Apêndice B) permitiu a obtenção de resultados que foram comparados estatisticamente (Apêndice D).

Os dados fornecidos pelo programa computacional Osteomeasure®, com as imagens fornecidas após análise estão demonstradas nas FIGURAs abaixo.



Derived Indices for Bx # 3839-2N

Volume Indices (%)			Rm.S/BS	=	10.0550
BV/TV	=	35.8779	LS/BS	=	0.0000
Vd.V/TV	=	3.3331	sL.S/BS	=	0.0000
OV/TV	=	0.6303	dL.S/BS	=	0.0000
OV/BV	=	1.7568	sL.S/LS	=	*
OV(Lm)/TV	=	0.6303	dL.S/LS	=	*
OV(Lm)/BV	=	1.7568	dL.S/sL.S	=	*
OV(Lm)/OV	=	100.0000	Al.BI/BS	=	0.0000
Fb.V/TV	=	0.0000	Al.BI/BI	=	*
Ma.V/TV	=	64.1221	Al.Md.S/BS	=	0.0000
Md.V/TV	=	35.2476	Al.Md.S/Md.S	=	0.0000
OV(Wo)/TV	=	0.0000	Al.ES/BS	=	0.0000
OV(Wo)/BV	=	0.0000	Al.ES/ES	=	0.0000
OV(Wo)/OV	=	0.0000	Al.Cm.I/BS	=	0.0000
S/V Indices (mm2/mm3)			Al.S/BS	=	0.0000
BS/TV	=	18.4443	Thickness Indices (um)		
BS/BV	=	51.4086	Tb.Th	=	38.9040
Surface Indices (%)			Tb.Pf.Th	=	0.0000
Vd.S/BS	=	20.4244	Vd.Th	=	17.6955
OS/BS	=	4.4205	Vd.Pf.Th	=	0.0000
OS(Lm)/BS	=	4.4205	O.Th	=	14.7540
OS(Lm)/OS	=	100.0000	O.Th(Lm)	=	14.7540
OS(Wo)/BS	=	0.0000	O.Th(Wo)	=	*
OS(Wo)/OS	=	0.0000	Fb.Th	=	*
BI/BS	=	0.0000	W.Th	=	*
BI(Lm)/BS	=	0.0000	Md.Th	=	*
BI(Lm)/BI	=	*	Ir.L.Th	=	*
BI(Wo)/BS	=	0.0000	Numeric Indices (/mm,mm2)		
BI(Wo)/BI	=	*	N.Ob/T.Ar	=	175.5127
Fb.I/BS	=	0.0000	N.Ob/B.Pm	=	12.1159
Ob.S/BS	=	22.9589	N.Ob/O.Pm(Lm)	=	274.0824
Ob.S/OS(Lm)	=	519.3694	N.Ob/Ob.Pm	=	52.7722
ES/BS	=	5.6345	N.Oc/T.Ar	=	7.5183
Oc.S/BS	=	1.4594	N.Oc/B.Pm	=	0.5190
QS/BS	=	89.9450	N.Oc/E.Pm	=	9.2110
Rv.S/BS	=	4.1751	N.Oc/Oc.Pm	=	35.5627

* denotes value currently undefined

FIGURA 21 – Exemplo dos resultados fornecidos pelo programa Osteomeasure®

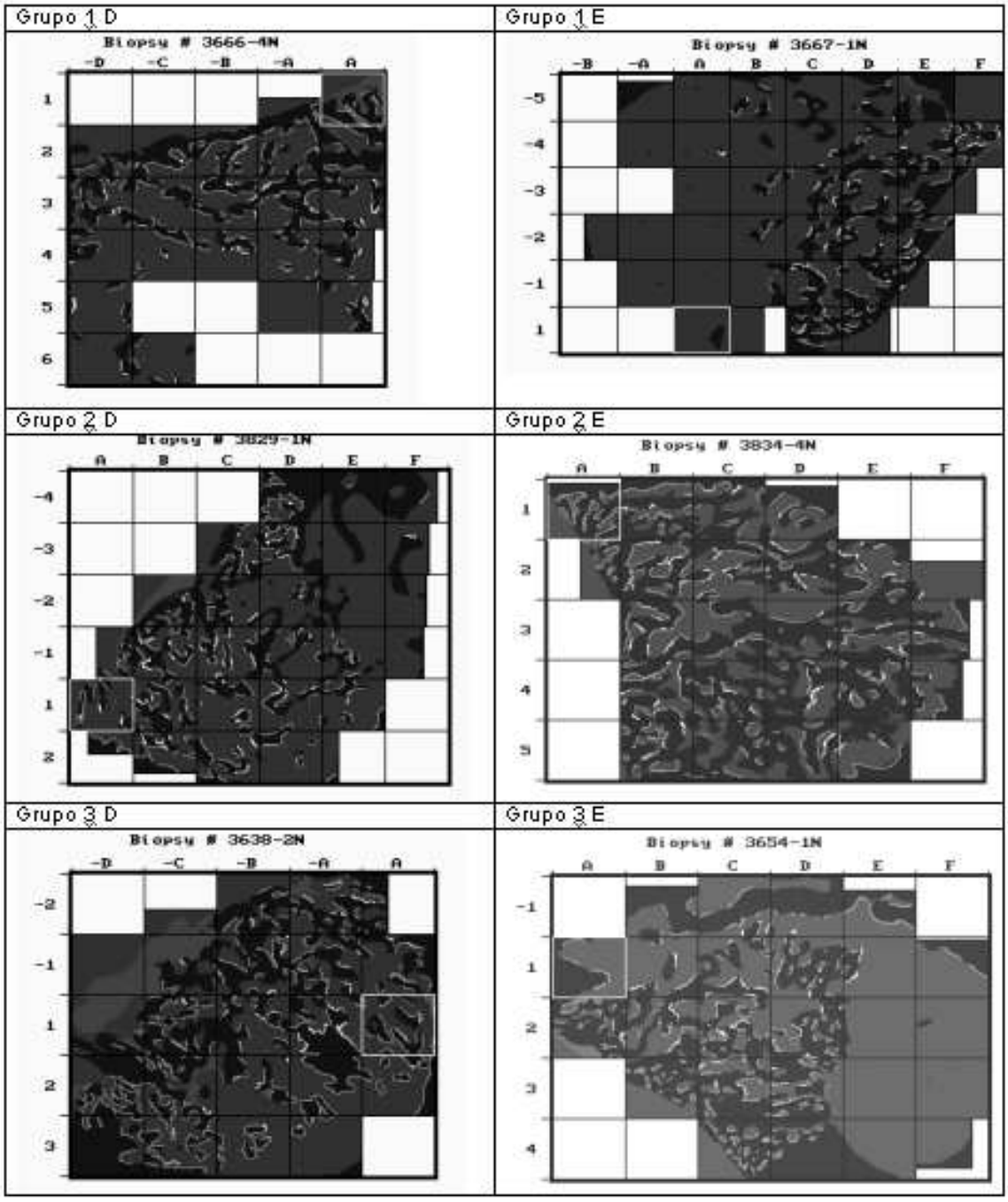


FIGURA 22 - Prancha com as imagens capturadas no programa computacional Osteomeasure®

Volume Ósseo

A medida do volume ósseo como porcentagem do volume total do tecido (BV/TV) (%) dos grupos 1, 2 e 3 não demonstrou significância estatística (p=0,2011) (FIGURA 21).

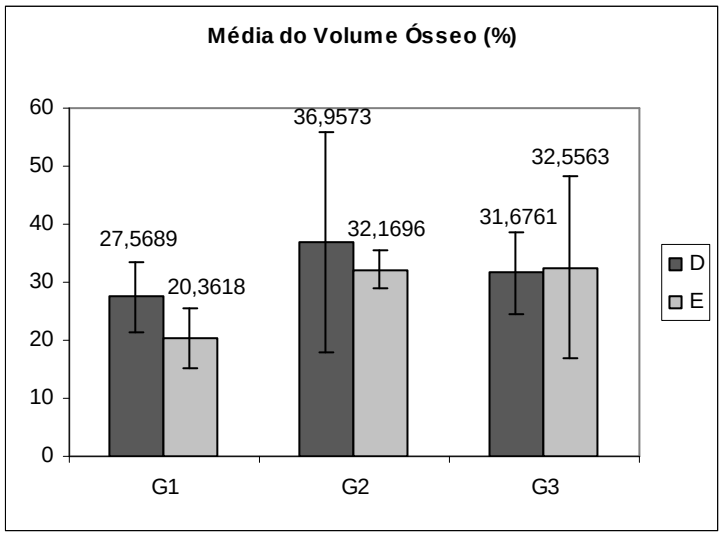


FIGURA 23 – Média da porcentagem de volume ósseo deste tecido observados nos três grupos experimentais.

Separação Trabecular e Número de Trabéculas

A separação trabecular (Tb.Sp) (µm) do grupo 1 no lado esquerdo (177,70±78,73) apresentou-se maior que o lado direito (107,94±30,46). O grupo 2 apresentou valores muito semelhantes quando comparados o lado direito (103,63±121,17) com o lado esquerdo (101,15±68,64). O lado direito do grupo 3 (93,45±26,67) apresentou-se maior que o lado esquerdo (79,12±26,12). Estas diferenças não foram estatisticamente significativas, com p = 0,2275 (FIGURA 22).

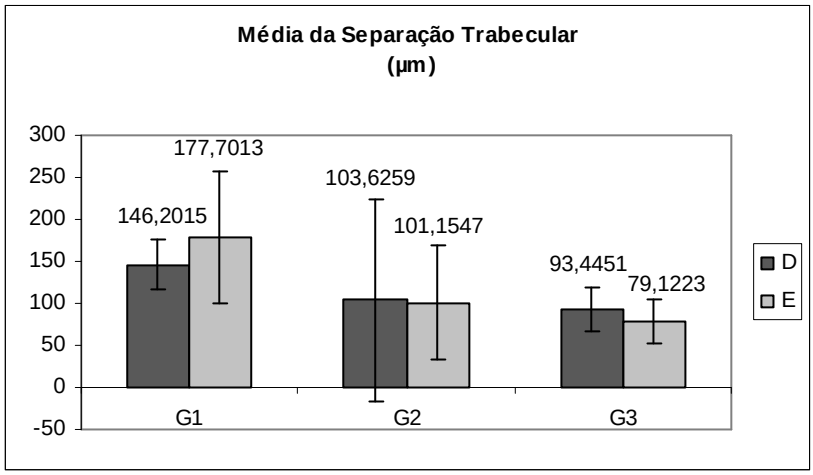


FIGURA 24 – Média da separação trabecular óssea observados nos três grupos experimentais.

A média do número de trabéculas ósseas (Tb.N) (mm^{-1})do grupo 1 apresentou-se maior no lado direito (7,06±1,53) que no esquerdo (4,78±1,37). Já as médias para ambos os lados dos grupos 2 e 3 foram muito semelhantes, não apresentando, diferenças significativas (p= 0,0792) (FIGURA 23).

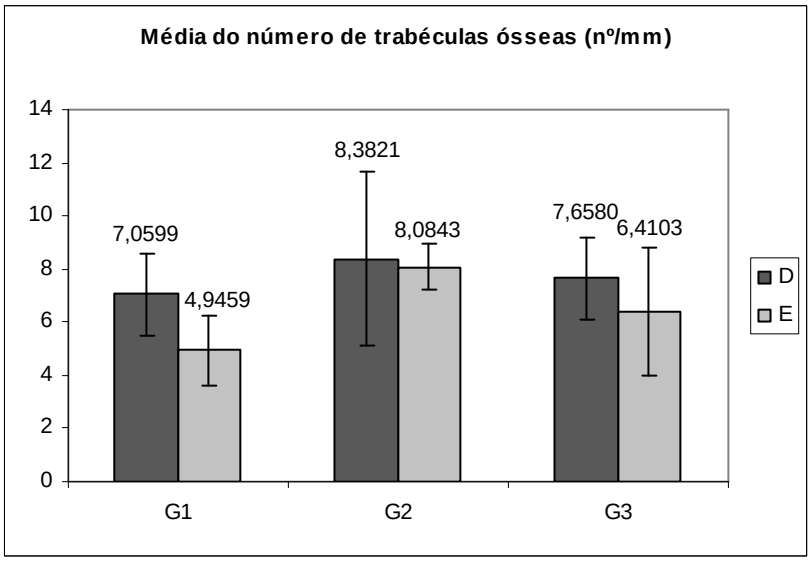


FIGURA 25 – Média do número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido observados nos três grupos experimentais.

Volume e Superfície Osteóide

As médias da proporção volume de osteóide/ volume ósseo (OV/BV) dos grupos 1, 2 e 3 para ambos os lados não apresentaram diferenças estatísticas significativas (p= 0,5476) (FIGURA 24) .

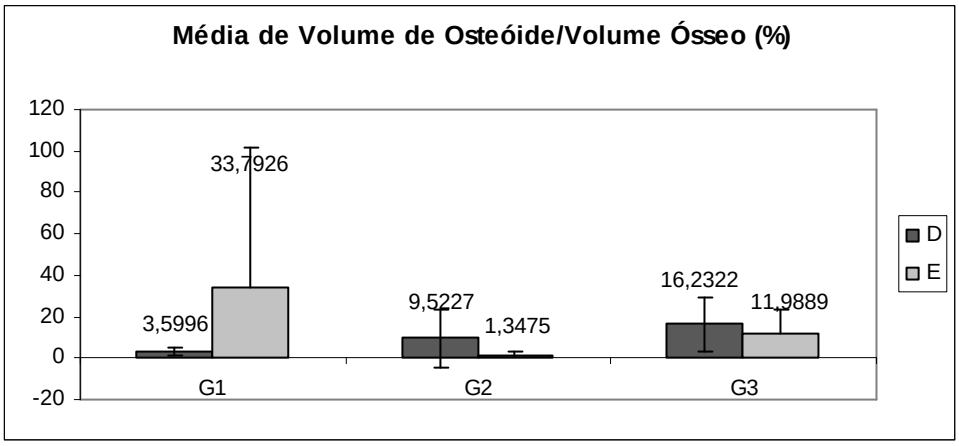


FIGURA 26 – Média da proporção de volume osteóide/ volume ósseo observados nos três grupos experimentais.

O resultado também foi semelhante para a comparação da proporção de superfície osteóide/ superfície óssea (OS/BS), entre os diferentes grupos, não havendo comparações significativas (p= 0,2174) (FIGURA 25)

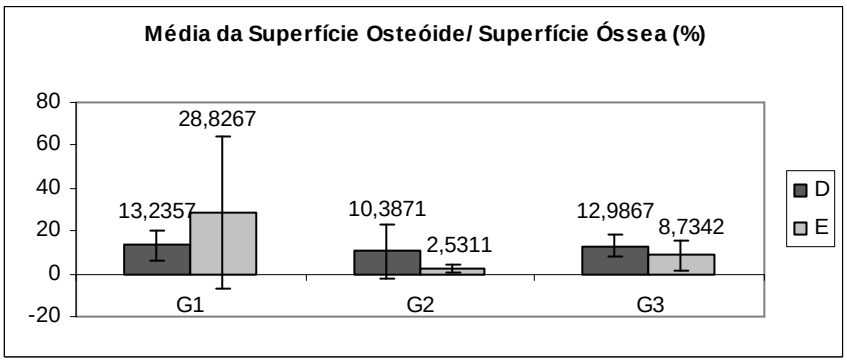


FIGURA 27 – Média da proporção de superfície osteóide/ superfície óssea observados nos três grupos experimentais.

Superfície de Osteoblastos e Densidade de Volume de Osteoblastos

A superfície de osteoblastos proporcional à superfície óssea (Ob.S/BS) mostrou-se maior no lado direito de todos os grupos (p= 0,1880) (FIGURA 26).

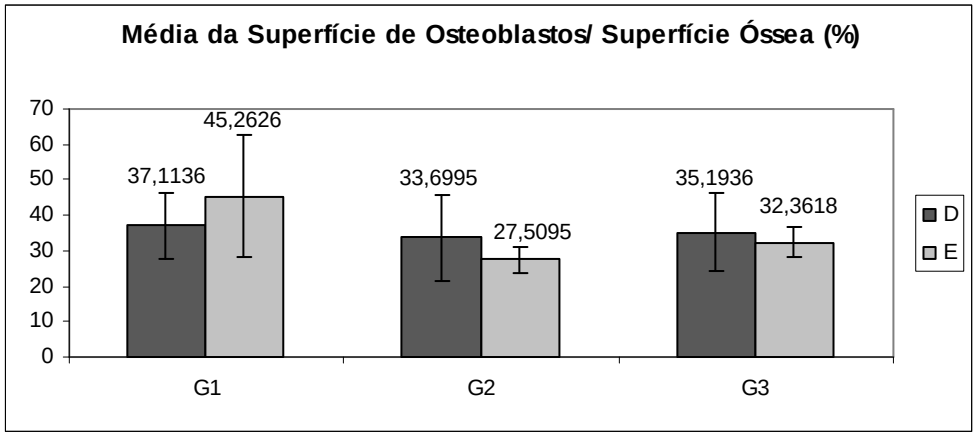


FIGURA 28 – Média da superfície de osteoblastos proporcional à superfície óssea analisada observados nos três grupos experimentais.

A densidade de volume de osteoblastos (N.Ob/T.Ar) comportou-se de maneira semelhante, tendo o lado tratado de todos os grupos apresentado-se maior que o lado esquerdo (p= 0,5152) (FIGURA 27). Embora os lados irradiados tenham se mostrado ligeiramente superiores na superfície e volume de osteoblastos, a análise estatística não foi significante.

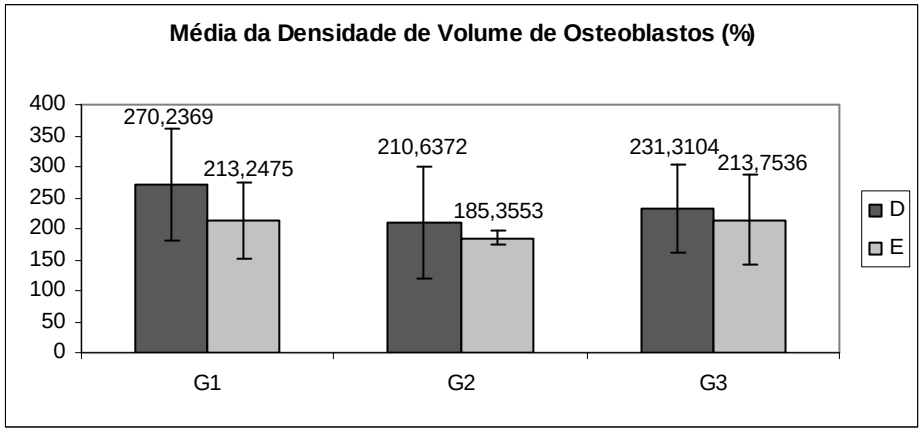


FIGURA 29 – Média do número de osteoblastos por unidade de área de tecido observada nos três grupos experimentais.

Superfície de Reabsorção

A média da superfície de reabsorção relativa à superfície óssea (ES/BS) dos diferentes grupos não apresentou relação estatística significativa entre os grupos (p= 0,6667) (FIGURA 28).

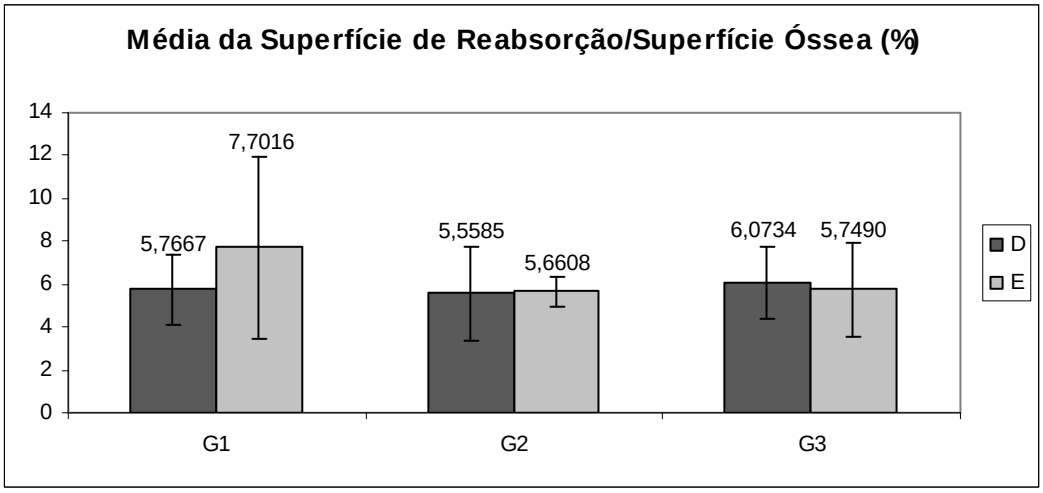


FIGURA 30 – Média da superfície de reabsorção relativa à superfície óssea observados nos três grupos experimentais.

Superfície de Osteoclastos e Densidade de Volume de Osteoclastos

Da mesma forma a média da superfície de osteoclastos (Oc.S/BS) dos diferentes grupos apresentou-se semelhante não havendo diferenças estatísticas significantes (p=0,3253) (FIGURA 29).

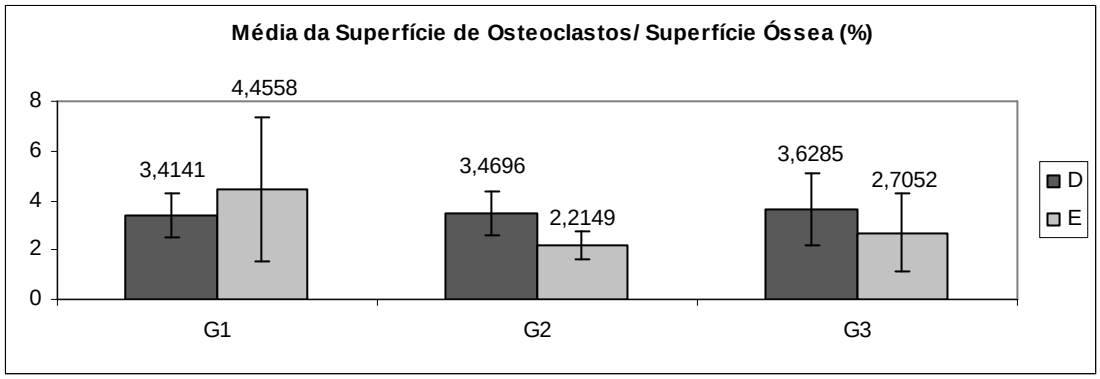


FIGURA 31 - Média da superfície de osteoclastos por unidade de superfície óssea observados nos três grupos experimentais.

A média da densidade de volume de osteoclastos, ou número de osteoclastos por área de tecido (N.Oc./T.Ar) apresentou-se maior no lado direito de todos os grupos, porém estas diferenças não foram estatisticamente significativas (p= 0,4846) (FIGURA 30).

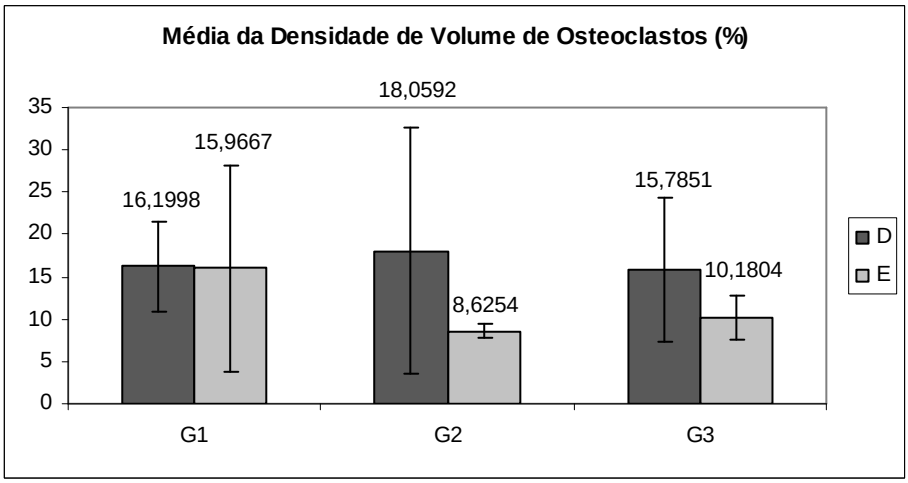


FIGURA 32 – Média do número de osteoclastos por unidade de área de tecido observados nos três grupos experimentais.

Espessura Trabecular

As médias da espessura trabecular dos grupos 1, 2 e 3 estão representadas na FIGURA 31. Não houve significância estatística para quaisquer comaprações entre os grupos para esta variável (p= 0,6582).

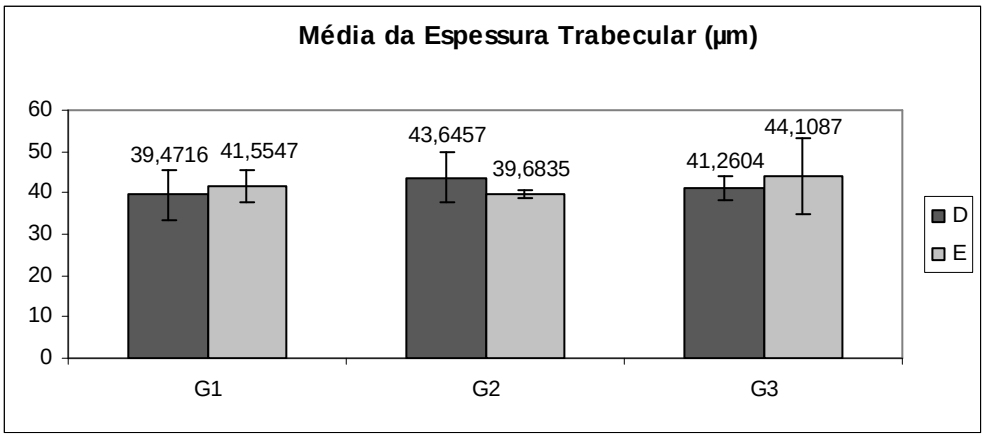


FIGURA 33 – Média da espessura trabecular observadas nos três grupos experimentais.

Os animais do grupo 3 – 36 dias e irradiados obtiveram a menor média, o que o torna semelhante ao grupo de animais não tratados com 15 dias, o que pode sugerir uma maior reabsorção óssea.

V. DISCUSSÃO

A suspensão pela cauda utilizada neste experimento foi baseada nos trabalhos de Silva (2004), Vicentini *et al* (2007) e Shimano (2006). Segundo Shimano (2006), alguns animais tiveram a cauda fraturada antes de completar 28 dias de suspensão e ao final do experimento apresentavam lesões graves na mesma. Já Silva (2004) e Norman et al. (2000), relataram a presença de necrose da extremidade da cauda e alguns animais de Vicentini et al. (2007) foram a óbito.

No presente trabalho, todos os animais tiveram suas caudas amputadas mesmo os que não foram suspensos. Nenhum animal foi a óbito durante o período experimental e dos 20 animais que permaneceram em suspensão nenhum apresentou sinais de necrose na cauda amputada. Isso pode ser explicado por uma pequena alteração no preparo da cauda do animal, que foi lavada com sabonete líquido antisséptico e substituída a tintura de Benjoin por Iodopovedine tópico. A modificação na realização do protocolo de suspensão pela cauda mostrou-se eficaz e capaz de prevenir danos ao animal causados pelo próprio modelo experimental.

A prévia suspensão do G3 por 21 dias a fim de induzir a osteopenia, foi baseada em trabalhos de animais suspensos pelo mesmo período que relatavam este tempo como suficiente para causar alterações na estrutura óssea (GALANTE, 1970; MARTIN, 1993; SILVA, 2004; VICENTINI *et al*, 2007), porém sem a análise densitométrica.

O processo de reparação óssea pode ser estudado e compreendido por meio de métodos qualitativos como Raios X e quantitativos como Absorciometria radiográfica (AR), Ultra-sonografia quantitativa (USQ), Tomografia computadorizada quantitativa (TCQ) e Absorciometria por Raios X de dupla energia (DEXA) que podem ser empregados na avaliação óssea (HODGSON, 2003). A densitometria óssea (DEXA) foi o critério de avaliação selecionado, por ser um método quantitativo e por ser o mais utilizado na

prática médica para se avaliar alterações na densidade óssea, tornando-se o método eleito para a confirmação da osteoporose.

Um aumento na densidade óssea ocorre com exercícios, com carga e após o tratamento com certos agentes terapêuticos. Além disso, alterações na geometria óssea são observadas durante o reparo ósseo, fenômeno este que acredita-se ser adaptativo (KAPLAN *et al*., 1994).

A análise densitométrica do osso como um todo evidenciou que o objetivo de se induzir a osteopenia foi alcançado, tendo de acordo com cada período de suspensão uma alteração decrescente da densidade mineral óssea. A DMO obtida nas amostras das tíbias tratadas e não tratadas do grupo1 mostrou-se significativamente maior que ambas as tíbias do grupo 3. Isso demonstra que ocorreu um decréscimo da densidade mineral óssea, indicando um quadro de osteopenia.

Quando analisada a região onde se criou o defeito ósseo, não se observou alterações quantitativas capazes de diferenciar os grupos entre si.

É importante salientar que os defeitos cirúrgicos preparados em outros estudos com laser tinham comprimento diferente dos defeitos criados no presente trabalho. Um tamanho reduzido do defeito poderia então justificar o melhor reparo ósseo observado por outros autores.

Neste trabalho os defeitos tinham 4X2mm, que segundo Schimitz e Hollinger (1986) são defeitos de tamanho crítico.

Melo (2003) trabalhou com cavidades de 4X2 mm e observou em seu grupo controle a inquestionável reparação óssea de todos os defeitos.

Na ocasião de uma fratura completa, incompleta ou osteotomia, juntamente com os eventos locais, os eventos sistêmicos são imediatamente desencadeados. Os primeiros eventos estão ligados à inflamação e parecem ter correlação com funções protetoras do organismo (MIKAIL & PEDRO, 2006).

Dessa forma, o resultado encontrado na análise densitométrica nos leva a entender que pelo fato de ser necessário uma reparação óssea bilateral, um efeito sistêmico qual pode ter sido desencadeado pela ação do laser. Outro fato a ser considerado é que a densitometria óssea deveria ser mensurada de

maneira volumétrica ou espacial (gramas por cm^3) e não como é atualmente expressa, em área ou superfície (gramas por cm^2) (MEIRELLES, 1999).

A análise dos resultados densitométricos não permitiu que os mesmos fossem confrontados com a literatura, uma vez que não encontramos trabalhos que relacionassem osso normal ou osteopênico, fraturas incompletas e laser terapêutico.

O uso da densitometria e da histomorfometria num mesmo estudo é importante porque enquanto um nos informa quantitativamente como se encontra a estrutura óssea, a análise histomorfométrica complementa estes resultados com dados mais específicos da composição óssea trabecular, indicando a fase de reparo em que o osso se encontra.

Pela análise histomorfométrica realizada na região da osteotomia (parâmetros estáticos - Tb.Sp (µm), Tb.N, BV/TV, OV/BV, OS/BS, Ob.S/BS, ES/BS, Oc.S/BS, Tb.Th, N.Ob/T.Ar, N.Oc/T.Ar) não observou-se diferenças estatísticas siginificativas na comparação entre os lados e entre os grupos. Isso nos dá a idéia de que um efeito sistêmico possa ter atuado ou mesmo que o laser não tenha influenciado o reparo ósseo.

Apesar de vários estudos destacarem o sucesso dessa terapia no tratamento de fraturas (FREITAS *et al*., 2000; GARAVELLO-FREITAS *et al*., 2003; LUGER *et al*., 1998; SILVA JÚNIOR *et al*., 2002, dentre outros autores), foram utilizados parâmetros e tempo de tratamento muito diferente, o que dificulta a comparação com os mesmos.

Além de parâmetros como de tempo e dosagem de tratamento, é relevante considerar que a quantidade e a qualidade do reparo ósseo, sob condições experimentais em modelo animal, são influenciadas pela espécie animal, idade, localização anatômica, envolvimento cortical (uni ou bicortical), presença ou ausência de periósteo e estabilidade do defeito (Aoboe et al., 1995).

Apesar dos diversos trabalhos que destacam os benefícios da terapia laser, estudos sugerem que tais efeitos possam ser manifestados não só no local da irradiação como também a nível sistêmico. Acredita-se que este efeito

se deva a mediadores metabólicos liberados na circulação, atingindo áreas distantes do local de aplicação (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; LAAKSO *et al*., 1993; OSHIRO, 1991; TUNER & HODE, 1991). Porém este efeito ainda é controverso, requerendo maiores estudos para tal afirmação.

VI. CONCLUSÃO

Através do presente estudo conclui-se que:

- Não houve influência do laser terapêutico de baixa intensidade associada à ausência de carga na microarquitetura óssea e nas propriedades histológicas.
- Pela análise densitométrica do osso todo, o período de 36 dias induziu a osteopenia por meio da suspensão de ratos pela cauda e mostrou ser um importante período para avaliar as alterações na microarquitetura óssea advindas com o envelhecimento.
- A modificação na realização do protocolo de suspensão pela cauda mostrou-se eficaz e capaz de prevenir danos ao animal causados pelo próprio modelo experimental.

VII. REFERÊNCIAS

AOBOE, M.; PINHOLD, E.M. HANSEM, E.H. Healing of experimentally created defects: a review. **Br. J. Oral Maxilofac. Surg**. v.33, n.5, p. 312-318.

AUBIN, J.E.; LIAN, J.B.; STEIN, G.S. Bone formation: maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. In: **American Society for Bone and Mineral Research**. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6. ed. Washington: ASBMR; 2006. p. 20 -29.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers Surg Med**. V.9, p. 1-5, 1989.

BARUSHKA, O., YAAKOBI, T., ORON, U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. **Bone,** v.16, n.1, p. 47–55, 1995.

BRASIL. BRASÍLIA. SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE. A osteoporose. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/005/00502001.asp?ttCD_CHAVE-9019. Acesso em: 20 de julho de 2008.

CARVALHO, D.C.L. et al. Tratamento não farmacológico na estimulação da osteogênese. **Rev. Saúde Pública**, v.36, n.5, p. 647-654, 2002.

COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON III, L.J. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. **Osteoporosis International**, v.2, p. 285-289, 1992.

COWIN, S.C. On Mechanosensation in bone under microgravity. **Bone**, v.22, Suppl.5, p.119S-125S, 1998.

FREITAS, I.G.F., BARANAUSKAS, V., CRUZ-HÖFLING, M.A. Laser effects on osteogenesis. **Appl. Surface Sci**., v.154–155, p. 548–554, 2000.

GALANTE, J.; ROSTOKER,W.; RAY, R.D. Physical properties of trabecular bone. **Calc Tiss Res**, Berlin, n.5, p. 236-246, 1970.

GARAVELLO-FREITAS, I., BARANAUSKAS, V., JOAZEIRO, P., et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J. Photochem. Photobiol**., v. 70, p. 81–89, 2003.

GIORDANO, V. et al. Influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos. **Rev. Bras. Ortop**., v.36, n.5, p. 174-178, 2001.

HODGSON, S. (Ed.) **Guia da clínica mayo sobre osteoporose**. Rio de Janeiro: Anima, 2005. p.60-66.

JONHSON, R.B. The bearable lightness of being: Bones, muscle, and spaceflight. **New Anat**. p.24-27, 1998.

JUNIOR, A.S.; et al. Computerized morphometric assessment of the effect of Low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J. Clin. Laser Med Surg**., v.20, n.2, p.83-87, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1999. p.111-128.

KAPLAN, F.S. et al. Form and function of bone. In: SIMON, S.R. **Orthopaedic Basic Science**. American Academy of Orthopaedic Surgeons.1994

KARU, T., PYATIBRAT, L., AND KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 27, p. 219–223, 1995.

KASPER, C.E., WHITE, T.P, MAXWELL, L.C. Running diuring recovery from hindlimb suspension induces muscular injury. **J. Appl Physiol.**, v.68, p.533-539, 1990.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Tecido ósseo. In:_____. **Histologia e embriologia oral**: texto - atlas e correlações clínicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 39-74.

KIM, K-S.; KIM, J-K.; KIM, S-W.; LEE, J-H.; KIM, Y-K.; KO, S-Y.; SHIMIZU, M. Effects of low level laser irradiation (LLLI) with 904 nm pulsed diode laser on osteoblasts: a controlles trial with the rat osteoblast model. **Laser Therapy**, v.8, p. 223-232, 1996.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. A review of low level laser therapy. **Physiotherapy**, v. 77, n.3, p.161-168, 1991.

LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Quality of light – is laser necessary for effective photobiostimulation? **Australian J. Physiotherapy**, v.39, n. 2, p. 87-92, 1993.

LIRANI, A.P.R. **Estudo comparativo dos efeitos do Ultra-som e do Laser de Baixa Potência no reparo ósseo de tíbia de rato**. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

LUGER, E.J. et al. Effect of low-power laser irradiation on mechanical properties of bone fracture healing rats. **Lasers Surgery Medicine,** v. 22, n.2, p.97-102, 1998.

MARINO, J.A.M. **Efeito do laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tíbia de rato**. 2003. 106f. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

MARTIN, R.B.; BOARDMAN, D.L. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density and mineralization on bovine cortical bone bending properties. **J. Biomech.,** n. 26, p. 1047-1054, 1993.

MATSUMOTO,T., NAKAYAMA,K., KADOMA,Y., FUSE,H., NAKAMURA,T., FUKOMOTO, S. Effect of mechanical unloading and reloading on perosteal bone formation and gene expression in tail- suspended rapidly growig rats. **Bone**, v.22, n.5, p. 89-93, 1998.

MEIRELLES, E.S. Diagnóstico por imagen na osteoporose. **Arq Bras Endocrinol Metab.,** v.43, n. 6, p. 423-427, 1999.

MELO, L.G.N. Avaliação do processo de reparo ósseo em cavidades cirúrgicas preenchidas com partículas de vidro bioativo associadoas ou não à barreira de sulfato de cálcio. Estudo histomorfométrico em tíbias de ratos. 2003. 165f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araçatuba.

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, p. 31-39, 1985.

MEZADRI, J.T.; TOMÁZ, V.A.; AMARAL, V.L.L. **Animais de Laboratório**: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

MIKAIL, S.; PEDRO, C.R. **Fisioterapia Veterinária**. Barueri, SP: Manole, 2006.

MOREY-HOLTON, E.R.; GLOBUS, R.K. Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skealetal ghanges during space flight. **Bone**, v.22, n.5, p.83-88, 1998.

MUSACHIA, XJ., DEAVERS, D.R., MEININGER, G.A., DAVIS, T.P. A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. **J. Appl.Physiol**, v.48, p. 479-486, 1983.

NINOMIYA, T. et al. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur. **J. Bone Miner Metab**., v.21, p.67–73, 2003.

NORMAN, T.L. et al. Aerobic Exercise as a countermeasure for microgravity-induced bone loss and muscle atrophy in a rat hindlimb suspension model. **Aviation, Space and Environmental Medicine**, Washington, v.71, n.6, p.593-598, 2000.

OHSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy pratical application** . Chichester: Ed. John Wiley & Sons, p.3-10, 1991.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M.K.; GLORIEUX, F.H.; KANIS, J.A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P.J. et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. **Journal of Bone and Mineral Research**., v. 2, n. 6, p. 595-610, 1987.

RENO, A.C.M. et al. The effects of infrared-830 nm laser on exercised osteopenic rats. **Lasers Med Sci**., v.21, p.202-207, 2006.

SHIMANO, M.M. **Microestruturas e propriedades mecânicas de ossos cortical e trabecular de ratos após período de suspensão pela cauda e exercitação**. (2006). 156f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SHIMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as na experimental model for cfraniomandibulofacial nonunions. Clin. Orthop., v. 205. p. 299-308, 1986.

SILVA, A.V.; VOLPON, J.B. Modelo de simulação de microgravidade e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortopédica Brasileira**. São Paulo, v.12, n.1, p.22-31, 2004.

TANG, X.M.; CHAI, B.P. Effect of CO_2 laser irradiation on experimental fracture healing: a transmission electron microscopic study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.6, p. 346-352, 1986.

TRELLES, M. A.; MAYAIO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 7, p. 36-45, 1987.

TUNÉR, J.; HODE, L. **Low level laser therapy**: clinical practice and scientific background. Sweden: Prima Books, 1999.

VALADARES, C. SUS gasta R$ 70 milhões com fraturas em idosos. Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=45977. Acesso em: 18 de abril de 2008.

VICENTINI, C.R.; ROSA, R.A.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; SANTOS, P.H.; LOUZADA, M.J.Q. Análise biomecânica em fêmures de ratos submetidos a ausência de carga e atividade física em esteira. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.14, n.1, p. 62-71, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A – DADOS RELATIVOS À ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

ANÁLISE DO OSSO TODO

G1 - Animal	DMO – D (g/cm²)	DMO – E (g/cm²)	CMO – D (g)	CMO – E (g)	Área – D (cm²)	Área – E (cm²)
1	0,205	0,199	0,332	0,321	1,571	1,613
2	0,224	0,218	0,334	0,349	1,537	1,602
3	0,211	0,211	0,313	0,317	1,48	1,502
4	0,192	0,196	0,295	0,276	1,532	1,408
5	0,206	0,181	0,292	0,261	1,421	1,443
6	0,218	0,207	0,309	0,315	1,419	1,521
7		0,201		0,317		1,576
8	0,167	0,18	0,258	0,259	1,549	1,436
9	0,195	0,157	0,28	0,258	1,442	1,646
10	0,183	0,157	0,261	0,217	1,427	1,383
Média	**0,200**	**0,191**	**0,297**	**0,289**	**1,486**	**1,513**
DP	0,018	0,021	0,028	0,041	0,061	0,093
CV (%)	8,92	11,20	9,32	14,06	4,12	6,17

G2 - Animal	DMO – D (g/cm²)	DMO – E (g/cm²)	CMO – D (g)	CMO – E (g)	Área – D (cm²)	Área – E (cm²)
1	0,161	0,113	0,233	0,181	1,448	1,596
2	0,214	0,2	0,35	0,328	1,636	1,641
3	0,171	0,162	0,264	0,265	1,55	1,635
4	0,155	0,165	0,244	0,248	1,572	1,501
5	0,219	0,198	0,338	0,312	1,545	1,575
6	0,161	0,209	0,253	0,341	1,575	1,633
7	0,173	0,149	0,257	0,233	1,483	1,564
8	0,221	0,209	0,344	0,325	1,555	1,552
9	0,196	0,196	0,311	0,306	1,587	1,561
10	0,198	0,216	0,306	0,328	1,547	1,516
média	**0,187**	**0,182**	**0,290**	**0,287**	**1,550**	**1,577**
DP	0,026	0,033	0,045	0,053	0,053	0,049
CV (%)	13,744	18,279	15,428	18,333	3,389	3,099

G3 - Animal	DMO – D (g/cm²)	DMO – E (g/cm²)	CMO – D (g)	CMO – E (g)	Área – D (cm²)	Área – E (cm²)
1	0,146	0,144	0,222	0,193	1,521	1,338
2	0,194	0,187	0,28	0,258	1,441	1,378
3	0,159	0,171	0,235	0,263	1,075	1,535
4	0,165	0,12	0,247	0,169	0,727	1,41
5	0,142	0,161	0,204	0,274	1,134	1,701
6	0,144	0,156	0,217	0,233	1,083	1,494
7	0,129	0,123	0,188	0,173	0,953	1,401
8	0,178	0,168	0,26	0,231	0,944	1,372
9	0,128	0,147	0,176	0,216	1,148	1,468
10	0,172	0,164	0,243	0,243	0,953	1,478
média	**0,156**	**0,154**	**0,227**	**0,225**	**1,098**	**1,458**
DP	0,022	0,021	0,032	0,037	0,237	0,106
CV (%)	13,917	13,668	14,220	16,410	21,552	7,251

ANÁLISE NA REGIÃO DA OSTEOTOMIA

G1 - Animal	DMO - D (g/cm²)	DMO – E (g/cm²)	CMO - D (g)	CMO - E (g)	Área - D (cm²)	Área – E (cm²)
1	0,169	0,165	0,06	0,059	0,356	0,356
2	0,168	0,186	0,06	0,066	0,356	0,357
3	0,173	0,164	0,062	0,059	0,357	0,356
4	0,15	0,148	0,053	0,053	0,356	0,357
5	0,156	0,142	0,056	0,052	0,356	0,365
6	0,187	0,17	0,067	0,06	0,357	0,356
7		0,166		0,059		0,356
8	0,147	0,146	0,052	0,052	0,357	0,355
9	0,164	0,14	0,058	0,05	0,355	0,355
10	0,158	0,118	0,056	0,042	0,355	0,357
Média	0,164	0,155	0,058	0,055	0,356	0,357
DP	0,012	0,018	0,004	0,006	0,001	0,003
CV (%)	7,160	11,897	7,542	11,594	0,207	0,772

G2 - Animal	DMO - D (g/cm²)	DMO – E (g/cm²)	CMO - D (g)	CMO - E (g)	Área - D (cm²)	Área - E (cm²)
1	0,150	0,09	0,053	0,032	0,355	0,355
2	0,175	0,183	0,063	0,066	0,357	0,357
3	0,175	0,16	0,062	0,057	0,356	0,355
4	0,127	0,152	0,045	0,054	0,357	0,354
5	0,196	0,195	0,07	0,069	0,356	0,354
6	0,126	0,178	0,045	0,063	0,357	0,355
7	0,162	0,125	0,058	0,044	0,356	0,354
8	0,196	0,181	0,07	0,064	0,355	0,356
9	0,167	0,185	0,059	0,066	0,355	0,355
10	0,169	0,188	0,06	0,067	0,357	0,356
Média	0,164	0,164	0,059	0,058	0,356	0,355
DP	0,024	0,033	0,009	0,012	0,001	0,001
CV (%)	14,820	20,342	15,016	20,488	0,246	0,280

G3 - Animal	DMO - D (g/cm²)	DMO – E (g/cm²)	CMO - D (g)	CMO - E (g)	Área - D (cm²)	Área – E (cm²)
1	0,138	0,134	0,049	0,048	0,355	0,355
2	0,191	0,181	0,068	0,064	0,355	0,355
3	0,147	0,159	0,052	0,056	0,354	0,355
4	0,157	0,106	0,056	0,038	0,355	0,355
5	0,142	0,174	0,051	0,062	0,355	0,354
6	0,155	0,157	0,055	0,056	0,356	0,355
7	0,113	0,112	0,04	0,04	0,354	0,355
8	0,191	0,166	0,067	0,059	0,354	0,354
9	0,108	0,145	0,038	0,052	0,355	0,355
10	0,157	0,198	0,056	0,07	0,355	0,355
Média	0,150	0,153	0,053	0,055	0,355	0,355
DP	0,028	0,029	0,010	0,010	0,001	0,000
CV (%)	18,384	19,198	18,349	18,777	0,178	0,119

APÊNDICE B – DADOS RELATIVOS À ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

GRUPO 1

CONTROLE E	Tb.Sp (µm)	Tb.N (/mm)	BV/TV (%)	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)
1	142,6884	5,5378	20,9827	15,1959	17,4627	39,4839
2	175,7309	4,6635	18,0482	4,6426	17,3467	52,9192
3	169,6345	4,6935	20,3812	0,5870	10,1000	24,0746
4	120,0154	6,3320	24,0062	2,6175	4,9703	40,2839
5	331,7576	2,6525	12,0010	171,7349	100,0009	74,8207
6	126,3810	5,7958	26,7517	7,9774	23,0795	39,9931
Média	**177,7013**	**4,9459**	**20,3618**	**33,7926**	**28,8267**	**45,2626**
Desvio	78,7269	1,2959	5,0942	67,7710	35,4388	17,1300
CV(%)	44,3030	26,2022	25,0183	200,5502	122,9375	37,8458

TRATADO D	Tb.Sp (µm)	Tb.N (/mm)	BV/TV (%)	OV/BV (%)	OS/BS (%)	Ob.S/BS (%)
1	105,2792	6,9913	26,3961	4,8736	17,9126	40,2205
2	140,3564	5,6310	20,9652	1,3225	7,3301	48,7510
3	104,8615	7,0846	25,7094	4,3302	11,9397	40,2906
4	75,4870	9,2859	29,9033	5,9109	11,7665	41,0276
5	75,4459	8,1770	38,3080	1,0202	6,7923	23,1584
6	146,2015	5,1893	24,1315	4,1399	23,6727	29,2335
Média	**107,9386**	**7,0599**	**27,5689**	**3,5996**	**13,2357**	**37,1136**
Desvio	30,4644	1,5329	6,0172	1,9814	6,4967	9,2449
CV(%)	28,2238	21,7132	21,8261	55,0453	49,0849	24,9097

GRUPO 1

CONTROLE	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	Tb.Th (µm)	N.Ob/T.Ar (mm²)	N.Oc/T.Ar (mm²)
1	8,8656	3,8086	37,8902	226,2134	11,5615
2	8,7351	4,0939	38,7012	274,4662	10,4915
3	4,3143	1,4594	43,4239	103,1214	6,0660
4	14,8703	8,8661	37,9124	265,8152	36,5260
5	3,0522	1,7050	45,2438	191,8718	6,0337
6	6,3720	6,8019	46,1567	217,9967	25,1215
Média	**7,7016**	**4,4558**	**41,5547**	**213,2475**	**15,9667**
Desvio	4,2112	2,9000	3,8241	62,1071	12,2684
CV(%)	54,6799	65,0835	9,2026	29,1244	76,8374

TRATADO	ES/BS (%)	Oc.S/BS (%)	Tb.Th (µm)	N.Ob/T.Ar (mm²)	N.Oc/T.Ar (mm²)
1	5,6830	3,5832	37,7555	272,4325	15,5043
2	7,2726	2,6944	37,2316	345,9564	7,4700
3	4,0647	2,9073	36,2889	288,3503	15,5213
4	8,1897	2,6947	32,2028	382,3520	14,9995
5	4,3450	3,5600	46,8487	189,8731	21,0616
6	5,0450	5,0450	46,5022	142,4571	22,6422
Média	**5,7667**	**3,4141**	**39,4716**	**270,2369**	**16,1998**
Desvio	1,6483	0,8947	5,9123	91,0189	5,3616
CV(%)	28,5833	26,2048	14,9787	33,6811	33,0969

GRUPO 2

CONTROLE			BV/TV	OV/BV	OS/BS	
E	**Tb.Sp (mm)**	**Tb.N (/mm)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**Ob.S/BS (%)**
1	217,2387	7,3498	30,1009	1,1686	3,7374	25,3449
2	101,8206	7,1070	27,6357	3,5528	3,4924	32,5894
3	77,9316	8,4258	34,3361	0,1350	0,4729	28,5739
4	69,5304	9,2222	35,8779	1,7568	4,4205	22,9589
5	39,2524	8,3167	32,8976	0,1245	0,5321	28,0804
Média	**101,1547**	**8,0843**	**32,1696**	**1,3475**	**2,5311**	**27,5095**
Desvio	68,6426	0,8602	3,3095	1,4168	1,8829	3,6283
CV(%)	67,8590	10,6409	10,2876	105,1363	74,3918	13,1892

TRATADO			BV/TV	OV/BV	OS/BS	
D	**Tb.Sp (mm)**	**Tb.N (/mm)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**Ob.S/BS (%)**
1	319,6831	2,8068	10,2712	14,7562	28,2694	43,5195
2	65,1530	8,4286	24,3820	31,7255	18,1948	45,7597
3	43,2377	9,5643	44,6865	0,9430	4,6784	15,1497
4	39,7833	11,0355	56,0970	0,0000	0,0000	31,0488
5	50,2726	10,0752	49,3496	0,1889	0,7929	33,0196
Média	**103,6259**	**8,3821**	**36,9573**	**9,5227**	**10,3871**	**33,6995**
Desvio	121,1714	3,2554	19,0389	13,8903	12,3821	12,1806
CV(%)	116,9316	38,8378	51,5161	145,8653	119,2066	36,1447

GRUPO 2

CONTROLE	ES/BS	Oc.S/BS			
E	**(%)**	**(%)**	**Tb.Th (µm)**	**N.Ob/T.Ar (mm²)**	**N.Oc/T.Ar (mm²)**
1	5,2189	2,1110	39,3457	180,7610	8,2322
2	5,6144	2,7945	38,8849	176,2030	9,8828
3	6,8649	1,9727	40,7509	203,8575	8,3253
4	5,6345	1,4594	38,9040	175,5127	7,5183
5	4,9711	2,7370	40,5322	190,4422	9,1686
Média	**5,6608**	**2,2149**	**39,6835**	**185,3553**	**8,6254**
Desvio	0,7286	0,5587	0,8971	11,9369	0,9147
CV(%)	12,8718	25,2262	2,2606	6,4400	10,6043

TRATADO	ES/BS	Oc.S/BS			
D	**(%)**	**(%)**	**Tb.Th (µm)**	**N.Ob/T.Ar (mm²)**	**N.Oc/T.Ar (mm²)**
1	2,7243	2,8870	36,5940	89,7956	4,0926
2	4,1924	4,5354	39,1613	228,4600	11,6921
3	5,9300	3,9157	42,6587	162,9210	42,6884
4	8,2719	2,2610	50,8330	329,5571	14,8087
5	6,6740	3,7488	48,9815	242,4522	17,0142
Média	**5,5585**	**3,4696**	**43,6457**	**210,6372**	**18,0592**
Desvio	2,1589	0,8962	6,1429	89,9324	14,6105
CV(%)	38,8399	25,8315	14,0744	42,6954	80,9031

GRUPO 3

CONTROLE	Tb.Sp	Tb.N	BV/TV	OV/BV	OS/BS	Ob.S/BS
E	**(mm)**	**(/mm)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**
1	96,9843	6,6701	35,3106	0,7516	2,3811	27,9027
2	70,2345	7,3616	33,4832	19,2991	13,1758	29,3329
3	109,4849	2,5344	23,3789	15,8442	13,773	38,5892
4	79,1245	6,4499	14,5118	24,0497	14,3413	34,9353
5	39,7833	9,0355	56,097	0	0	31,0488
Média	**79,1223**	**6,4103**	**32,5563**	**11,9889**	**8,7342**	**32,3618**
Desvio	26,7745	2,3921	15,5920	10,9975	6,9499	4,3642
CV(%)	33,8393	37,3163	47,8923	91,7301	79,5709	13,4857

TRATADO	Tb.Sp	Tb.N	BV/TV	OV/BV	OS/BS	Ob.S/BS
D	**(mm)**	**(/mm)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**	**(%)**
1	119,1509	6,3082	24,8373	1,8991	4,4066	27,9905
2	87,9048	7,4499	34,5118	24,0497	14,3413	34,9353
3	79,5505	8,3616	33,4832	19,2991	16,1758	46,3329
4	121,4541	6,2261	24,382	31,7255	18,1948	45,7597
5	59,165	9,944	41,1664	4,1878	11,8152	20,9496
Média	**93,4451**	**7,6580**	**31,6761**	**16,2322**	**12,9867**	**35,1936**
Desvio	26,6654	1,5521	7,0948	12,8556	5,3414	11,0744
CV(%)	28,5359	20,2682	22,3980	79,1980	41,1293	31,4671

GRUPO 3

CONTROLE	ES/BS	Oc.S/BS	Tb.Th	N.Ob/T.Ar	N.Oc/T.Ar
E	**(%)**	**(%)**	**(µm)**	**(mm²)**	**(mm²)**
1	7,5158	2,1095	52,9386	180,5338	8,8909
2	5,7824	1,9115	46,5788	135,0899	8,7749
3	4,0234	1,737	30,1488	227,6543	8,2311
4	3,1514	5,5068	40,0441	195,933	10,1963
5	8,2719	2,261	50,833	329,5571	14,8087
Média	**5,7490**	**2,7052**	**44,1087**	**213,7536**	**10,1804**
Desvio	2,1916	1,5786	9,2288	72,8231	2,6860
CV(%)	38,1220	58,3569	20,9229	34,0687	26,3846

TRATADO	ES/BS	Oc.S/BS	Tb.Th	N.Ob/T.Ar	N.Oc/T.Ar
D	**(%)**	**(%)**	**(µm)**	**(mm²)**	**(mm²)**
1	7,4184	3,7915	39,3732	144,0306	11,3101
2	8,1514	5,5068	46,3252	195,933	17,1963
3	5,7824	1,9115	40,0441	335,0899	8,7749
4	4,1924	4,5354	39,1613	228,46	11,6921
5	4,8224	2,3975	41,3982	253,0385	29,9523
Média	**6,0734**	**3,6285**	**41,2604**	**231,3104**	**15,7851**
Desvio	1,6819	1,4866	2,9630	70,9220	8,4944
CV(%)	27,6926	40,9710	7,1813	30,6610	53,8129

APÊNDICE C – DADOS ESTATÍSTICOS RELATIVOS À ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

Dados Estatísticos da DMO (g/cm²) do osso todo						
	N = 10					
	G1 – D	**G1 - E**	**G2 - D**	**G2 - E**	**G3 - D**	**G3 - E**
Média	0,2001	0,1907	0,1869	0,1817	0,1571	0,1541
DP	0,0178	0,0214	0,0257	0,0332	0,0218	0,0211
Erro Padrão da Média	0,0060	0,0068	0,0081	0,0105	0,0069	0,0067
Lim. Inf. 95%	0,1864	0,1754	0,1685	0,1579	0,1402	0,1390
Lim. Sup. 95%	0,2138	0,2060	0,2053	0,2055	0,1712	0,1692
Min.	0,1670	0,1570	0,1550	0,1130	0,1280	0,1200
Mediana	0,2050	0,1975	0,1845	0,1970	0,1525	0,1585
Máx.	0,2240	0,2180	0,2210	0,2160	0,1940	0,1870

Análise de variância unilateral de ANOVA com nível de significância p<0,05, distribuição gaussiana e teste de comparação múltiplas de Tukey-Krammer.

Para as análises da DMO do osso todo, p = 0,0002.

Teste de comparação de Tukey-Kramer			
comparação	**média da diferença**	**q**	**valor de p**
G1 D vs G1 E	0,009411	1,203	ns p> 0,05
G1 D vs G2 D	0,01321	1,688	ns p> 0,05
G1 D vs G2 E	0,01841	2,353	ns p> 0,05
G1 D vs G3 D	0,04441	5,676	* p< 0,01
G1 D vs G3 E	0,04601	5,880	* p< 0,01
G1 E vs G2 D	0,003800	0,4990	ns p> 0,05
G1 E vs G2 E	0,009000	1,182	ns p> 0,05
G1 E vs G3 D	0,03500	4,596	* p< 0,05
G1 E vs G3 E	0,03660	4,806	* p< 0,05
G2 D vs G2 E	0,005200	0,6828	ns p> 0,05
G2 D vs G3 E	0,03120	4,097	ns p> 0,05
G2 E vs G3 D	0,03280	4,307	* p< 0,05
G2 E vs G3 E	0,02600	3,414	ns p> 0,05
G2 E vs G3 E	0,02760	3,624	ns p> 0,05
G3 D vs G3 E	0,001600	0,2101	ns p> 0,05

Dados Estatísticos da DMO (g/cm²) na região da osteotomia						
	N = 10					
	G1 – D	**G1 - E**	**G2 - D**	**G2 - E**	**G3 - D**	**G3 – E**
Média	0,1635	0,1545	0,1643	0,1637	0,1499	0,1532
DP	0,0124	0,0194	0,0243	0,0333	0,0275	0,0294
Erro Padrão da Média	0,0041	0,0061	0,0077	0,0105	0,0087	0,0093
Lim. Inf. 95%	0,1540	0,1406	0,1469	0,1399	0,1302	0,1322
Lim. Sup. 95%	0,1731	0,1684	0,1817	0,1875	0,1696	0,1742
Min.	0,1470	0,1180	0,1260	0,0900	0,1080	0,1060
Mediana	0,1640	0,1560	0,1680	0,1795	0,1510	0,1580
Máx.	0,1870	0,1860	0,1960	0,1950	0,1910	0,1980

p = 0,06880

APÊNDICE D – DADOS ESTATÍSTICOS RELATIVOS À ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.

Dados Estatísticos da distância entre trabéculas Tb.Sp (µm)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 – D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 - E**	**G3 – D**
Média	177,7013	107,9385	101,1547	103,6259	79,1223	93,4450
DP	78,727	30,464	68,643	121,17	26,774	26,665
Erro Padrão da Média	32,140	12,437	30,698	54,190	11,974	11,925
Lim. Inf. 95%	95,069	75,963	15,937	-46,804	45,883	60,341
Lim. Sup. 95%	260,33	139,91	186,37	254,06	112,36	126,55
Min.	120,02	75,446	39,252	39,783	39,783	59,165
Mediana	156,16	105,07	77,932	50,273	79,125	87,905
Máx.	331,56	146,20	217,24	319,68	109,48	121,45

p = 0,2275

Dados Estatísticos do número de trabéculas Tb.N (mm)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 - E**	**G3 – D**
Média	4,7758	7,0598	8,0843	8,3820	6,4103	7,6579
DP	1,372	1,533	0,860	3,255	2,392	1,5552
Erro Padrão da Média	0,6136	0,6258	0,3847	1,456	1,070	0,6941
Lim. Inf. 95%	3,072	5,451	7,016	4,341	3,441	5,731
Lim. Sup. 95%	6,479	8,669	9,152	12,424	9,380	9,585
Min.	2,653	5,189	7,107	2,807	2,534	6,226
Mediana	4,694	9,286	9,222	11,036	9,036	9,944
Máx.	6,332	9,286	9,222	11,036	9,036	9,944

p = 0,0792

Dados Estatísticos do volume ósseo (BV/TV) (%)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 - E**	**G3 – D**
Média	20,3618	27,5689	32,1696	36,9572	32,5563	31,6761
DP	5,094	6,017	3,309	19,039	15,592	7,095
Erro Padrão da Média	2,080	2,457	1,480	8,514	6,973	3,173
Lim. Inf. 95%	15,015	21,253	28,061	13,321	13,199	22,868
Lim. Sup. 95%	25,709	33,885	36,278	60,593	51,913	40,484
Min.	12,001	20,965	27,636	10,271	14,512	24,382
Mediana	20,682	26,053	32,898	44,687	33,483	33,483
Máx.	26,752	38,308	35,878	56,097	56,097	41,166

p = 0,2011

Dados Estatísticos do volume de osteóide/ volume ósseo (OV/BV) (%)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 – D**	**G3 - E**	**G3 – D**
Média	33,7925	3,5995	1,3475	9,5222	11,9889	16,2332
DP	67,771	1,981	1,417	13,890	10,997	12,856
Erro Padrão da Média	27,667	0,8089	0,6336	6,212	4,918	5,749
Lim. Inf. 95%	-37,340	1,520	-0,4113	-7,722	-1,664	0,2725
Lim. Sup. 95%	104,93	5,679	3,106	26,767	25,642	32,192
Min.	0,5870	1,020	0,1245	0,0000	0,0000	1,899
Mediana	6,310	4,235	1,169	0,9430	15,844	19,299
Máx.	171,73	5,911	3,553	31,726	24,050	31,726

p = 0,5476

Dados Estatísticos da Superfície Osteóide / Superfície Óssea (OS/BS) (%)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 – D**	**G3 - E**	**G3 – D**
Média	28,8266	13,2356	2,5310	10,3871	8,7342	12,9867
DP	35,439	6,497	1,883	12,382	6,950	5,341
Erro Padrão da Média	14,468	2,652	0,8421	5,537	3,108	2,389
Lim. Inf. 95%	-8,370	6,417	0,1935	-4,985	0,1062	6,356
Lim. Sup. 95%	66,023	20,055	4,869	25,759	17,362	19,618
Min.	4,970	6,792	0,4729	0,000	0,000	4,407
Mediana	17,405	11,853	3,492	4,678	13,176	14,341
Máx.	100,00	23,673	4,421	28,269	14,341	18,195

p = 0,2174

Dados Estatísticos da Superfície de Osteoblastos - Ob.S/BS (%)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 - E**	**G3 – D**
Média	45,2625	37,1136	27,5095	33,6994	32,3617	35,1936
DP	17,130	9,245	3,628	12,181	4,364	11,074
Erro Padrão da Média	6,993	3,774	1,623	5,447	1,952	4,953
Lim. Inf. 95%	27,283	27,410	23,005	18,578	26,944	21,445
Lim. Sup. 95%	63,242	46,817	32,014	48,821	37,780	48,942
Min.	24,075	23,158	22,959	15,150	27,903	20,950
Mediana	40,139	40,256	28,080	33,020	31,049	34,935
Máx.	74,821	48,751	32,589	45,760	38,589	46,333

p = 0,1880

Dados Estatísticos da Superfície de Reabsorção (ES/BS) (%)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 – E**	**G3 – D**
Média	7,7015	5,7666	5,6607	5,5585	5,7489	6,0734
DP	4,211	1,648	0,7286	2,159	2,192	1,682
Erro Padrão da Média	1,719	0,6729	0,3259	0,9655	0,9801	0,7522
Lim. Inf. 95%	3,281	4,037	4,756	2,878	3,028	3,985
Lim. Sup. 95%	12,122	7,497	6,565	8,239	8,470	8,161
Min.	3,052	4,065	4,971	2,724	3,151	4,192
Mediana	7,554	5,364	5,614	5,930	5,782	5,782
Máx.	14,870	8,190	6,865	8,272	8,272	8,151

p = 0,6667

Dados Estatísticos da Superfície de Osteoclastos - Oc.S/BS(%)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 – E**	**G3 – D**
Média	4,4558	3,4141	2,2149	3,4695	2,7051	3,6285
DP	2,900	0,8947	0,5587	0,8962	1,579	1,487
Erro Padrão da Média	1,184	0,3652	0,2499	0,4008	0,7060	0,6648
Lim. Inf. 95%	1,412	2,475	1,521	2,357	0,7453	1,783
Lim. Sup. 95%	7,500	4,353	2,909	4,582	4,665	5,474
Min.	1,459	2,694	1,459	2,261	1,737	1,912
Mediana	3,951	3,234	2,111	3,749	2,110	3,792
Máx.	8,866	5,045	2,795	4,535	5,507	5,507

p = 0,3253

Dados Estatísticos da Espessura Trabecular - Tb.Th (µm)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 – E**	**G3 – D**
Média	41,5547	39,4716	39,6835	43,6457	44,1086	41,2604
DP	3,824	5,912	0,8971	6,143	9,229	2,963
Erro Padrão da Média	1,561	2,414	0,4012	2,747	4,127	1,325
Lim. Inf. 95%	37,541	33,266	38,570	36,020	32,651	37,582
Lim. Sup. 95%	45,569	45,677	40,797	51,272	55,566	44,939
Min.	37,890	32,203	38,885	36,594	30,149	39,161
Mediana	41,063	37,494	39,346	42,659	46,579	40,044
Máx.	46,157	46,849	40,751	50,833	52,939	46,325

p = 0,6582

Dados Estatísticos da Densidade de Volume de Osteoblastos - N.Ob/T.Ar (mm²)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 – E**	**G3 – D**
Média	213,2474	270,2369	185,3552	210,6371	213,7536	231,3104
DP	62,107	91,019	11,937	89,932	72,823	70,922
Erro Padrão da Média	25,355	37,158	5,338	40,219	32,567	31,717
Lim. Inf. 95%	148,06	174,70	170,54	98,989	123,35	143,26
Lim. Sup. 95%	278,44	365,77	200,17	322,29	304,16	319,36
Min.	103,12	142,46	175,51	89,796	135,09	144,03
Mediana	222,11	280,39	180,76	228,46	195,93	228,46
Máx.	274,47	382,35	203,86	329,56	329,56	335,09

p = 0,5152

Dados Estatísticos da Densidade de Volume de Osteoclastos - N.Oc/T.Ar (mm²)						
	N = 5					
	G1 – E	**G1 - D**	**G2 - E**	**G2 - D**	**G3 – E**	**G3 – D**
Média	15,9667	16,1998	8,6254	18,0592	10,1803	15,7851
DP	12,268	5,362	0,9147	14,610	2,686	8,494
Erro Padrão da Média	5,009	2,189	0,4091	6,534	1,201	3,799
Lim. Inf. 95%	3,090	10,572	7,490	-0,079	6,846	5,240
Lim. Sup. 95%	28,844	21,827	9,761	36,198	13,515	26,331
Min.	6,034	7,470	7,518	4,093	8,231	8,775
Mediana	11,027	15,513	8,325	14,809	8,891	11,692
Máx.	36,526	22,642	9,883	42,688	14,809	29,952

p = 0,4846

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo