UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor

SUELEN ALBERTINI MARIANO

Efeitos da terapia por vibração no tecido ósseo e cartilaginoso de ratos em fase de crescimento

**Ribeirão Preto
2021**

SUELEN ALBERTINI MARIANO

Efeitos da terapia por vibração no tecido ósseo e cartilaginoso de ratos em fase de crescimento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Orientadora: Dra. Arianne Zamarioli

Ribeirão Preto

2021

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Albertini-Mariano, Suelen

Efeitos da terapia por vibração no tecido ósseo e cartilaginoso
de ratos em fase de crescimento, 2021.

144 fls.: Il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto/USP.

Orientadora: Dra. Ariane Zamarioli.

1. vibração. 2. placa de crescimento. 3. tecido ósseo. 4.
rato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Suelen Albertini Mariano

Efeitos da terapia por vibração no tecido ósseo e cartilaginoso de ratos em fase de crescimento.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus, pois Ele quem entregou Seu Filho Único Jesus numa cruz para nos salvar e com amor divinal me deu o dom da vida e a oportunidade de fazer e ser história nesse mundo. Por me permitir o imensurável prazer de conhecer pessoas especiais, em que algumas fizeram e outras tantas ainda fazem parte de minha vida. Gratidão e devoção eterna.

Ao meu esposo Rodrigo que desde a adolescência esteve ao meu lado, que me ajudou como ninguém quando até para levar uma colher à boca eu precisei, por ser meu cúmplice, meu amante, meu amigo e o amor da minha vida! Muito obrigada meu príncipe, te amo para sempre até a eternidade!

Aos meus pais Emílio e Teresa que por toda a minha vida realizaram sacrifícios imensuráveis para que eu e meus irmãos pudéssemos ter tudo o que precisássemos, principalmente o amor, o carinho, as horas de madrugada quando um de nós estávamos doentes, os sorrisos ao retornarmos da escola, o comparecer em cada reunião escolar, em cada apresentação de dança que participei principalmente pelo exemplo de dignidade, honestidade e perseverança. Muito obrigada! Nunca serei capaz de retribuir tudo o que os senhores são e representam em minha vida. Amo vocês demais!

Aos meus irmãos Leandro e André que desde a infância foram e são meus melhores amigos, aqueles que posso contar em todos os momentos, sejam eles felizes ou não. Obrigada pelo amor, abraços, força e entusiasmo! Deus sabia muito bem o que fazia quando me deu vocês dois de presentes, um logo no meu segundo natal de vida (Leandro) e o outro (André) quando eu fiz 8 anos de idade. Obrigada meus lindos, amo vocês!

Aos meus filhos de quatro patas: Lucky que a 14 anos me recebe sempre com amor, carinho e alegria quando retorno para casa. Você é um exemplo de que Deus cuida de cada um de nós de formas diferentes, no meu caso, tenho um anjo onde duas asas se tornaram em patas.

E Nina, tão carinhosa e manhosa, me alegra e dá força para prosseguir, me mostrou que mesmo com tanta dor pode dar carinho ao invés de vingança, obrigada anjinha linda, você coloriu muito mais nossos dias desde que chegou em casa.

Dedico este trabalho

Agradecimientos

À **Dra. Ariane Zamarioli**, pela orientação que me propiciou o conhecimento necessário para o desenvolvimento deste estudo, além da contribuição para meu crescimento pessoal, acadêmico e científico. Muito obrigada pela receptividade, pela paciência, as acuradas leituras, os acertados comentários e inúmeras sugestões feitas durante o desenvolvimento da pesquisa e a escrita da dissertação e do artigo.

Ao **Prof. Dr. José Batista Volpon**, chefe do Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP e co-orientador desta Dissertação de Mestrado, pela disponibilidade do laboratório, pela contribuição direta e indireta no enriquecimento deste estudo e por todo o conhecimento oferecido, tanto no âmbito pessoal, como profissional, durante o período de convivência no laboratório. Muito obrigada por transmitir parte de seu conhecimento e experiência, além da confiança depositada em mim durante todos esses anos.

Ao **Prof. Dr. José Antunes Rodrigues** pela disponibilidade do **Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** e a técnica **Maria Valci**, pelo auxílio na eutanásia dos animais e no processo de extração das amostras. Muito obrigada.

À **Profa. Raquel Assed Bezerra Segato** pela disponibilidade do **Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da FORP** e aos técnicos **Fátima Aparecida, Marco Antônio e Nilza Letícia**, pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas, que não mediram esforços e sempre solícitos em todo o progresso das análises histológicas. Muito obrigada.

Aos funcionários do Laboratório de Bioengenharia: **Francisco Mazzocato, Ismar Ribeiro, Maria Teresinha de Moraes e Reginaldo Trevilatto Silva** pelo auxílio e disponibilidade para a conclusão desta dissertação de mestrado.

À secretária do Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da FMRP-USP **Rita de Cássia S. Cossalter**, pela atenção e orientação prestadas desde o início até a conclusão do mestrado. Obrigada pelo zelo e preocupação em informar todas as etapas da defesa e entrega de documentos.

Às amigas **Iara Botega, Mariana Butezloff, Patrícia Madalena e Roberta Shimano** que sempre me auxiliaram durante a execução dos meus experimentos, pela paciência, pelas longas conversas, conselhos, zelo e companheirismo, serei sempre grata pela ajuda e carinho de cada uma de vocês.

Aos alunos de pós-graduação e amigos de laboratório **Leonardo Rigobello e Rita** pelo constante apoio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Albertini-Mariano, S. Efeitos da terapia por vibração no tecido ósseo e cartilaginoso de ratos em fase de crescimento, 2021. 144 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

Fundamento: A plataforma vibratória tem sido utilizada como coadjuvante em diversos tratamentos, bem como em treinamentos físicos de alto rendimento esportivo. A terapia por vibração como método profilático e terapêutico de distúrbios osteometabólicos tem sido empregada por diversos autores e mostrado resultados positivos para a melhora da qualidade óssea. Resultados envolvendo aumento de força muscular e potência também contribuem para a maior disseminação e utilização do recurso, incluindo tratamento em idade de crescimento. No entanto, há escassez de literatura associando os efeitos da vibração sobre a placa de crescimento, que pode ser nocivo. Além disso, não há consenso e conhecimento suficiente sobre os diferentes parâmetros da plataforma vibratória e seus efeitos nos tecidos ósseo e cartilaginoso. **Objetivos:** Comparar diferentes protocolos de frequência da plataforma vibratória no tecido ósseo e na cartilagem de crescimento de ratos saudáveis, em fase de maturação esquelética, bem como analisar o efeito tardio da interrupção da terapia por vibração nesses tecidos. **Materiais e Métodos:** 72 ratos machos de aproximadamente 120 gramas ($\pm 10g$) foram aleatoriamente distribuídos em três grupos ($n=24/\text{grupo}$): (1) Sham: ratos placebo, sem uso da vibração; (2) TV 5Hz: ratos submetidos à terapia por vibração com frequência de 5Hz e; (3) TV 50Hz: ratos submetidos à terapia por vibração com frequência de 50Hz. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos ($n=12/\text{subgrupo}$), de acordo com o período experimental. Em um subgrupo (4s) os animais foram submetidos à vibração (ou placebo) por 4 semanas e, em outro (16s) os animais também foram submetidos à vibração (ou placebo) por 4 semanas, mas o seguimento sem intervenção (placebo) persistiu por mais 12 semanas, totalizando 16 semanas. Ao término dos períodos experimentais, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta e análise óssea dos fêmures, tíbias, vértebras e parietais, bem como da placa de crescimento das tíbias. A qualidade do tecido ósseo (trabecular e cortical) e da placa de crescimento foi investigada por meio de análises macroscópica, densitométrica, microtomográfica, mecânica, histológica e histomorfométrica. **Resultados:** Os resultados das análises evidenciaram efeitos positivos na qualidade óssea e cartilaginosa em resposta à terapia por vibração com frequência de 50Hz. Com este protocolo foi possível observar aumento na densidade mineral óssea, no conteúdo mineral ósseo e em diversos parâmetros microtomográficos relacionados à formação óssea no tecido trabecular e cortical (TV, BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Ct.TV, Ct.BV, Ct.BV/TV e Ct.Th), concomitante à redução nos parâmetros de reabsorção óssea (Tb.Sp, BS/BV e SMI) em fêmures e tíbias. As análises histológicas corroboram os achados anteriores e também evidenciam importante efeito osteogênico e condrogênico resultante da terapia por vibração com frequência de 50Hz, em que foi detectado aumento no número de trabéculas com maior quantidade de osteócitos, trabéculas mais espessas, melhora na organização das colunas celulares e estimulação aumentada da zona proliferativa na cartilagem de crescimento. Efeitos positivos também foram detectados nas análises mecânicas, com maior resistência para os ossos submetidos à vibração com 50Hz. Além disso, os efeitos benéficos deste protocolo de vibração persistiram em fase tardia, mesmo após sua interrupção. Por outro lado, a frequência de 5Hz não evidenciou efeitos positivos no tecido ósseo e cartilaginoso, e em algumas análises foi possível detectar efeitos negativos (medidas macroscópicas, massa óssea, parâmetros microestruturais trabeculares e corticais e mecânicos), que persistiram em fase tardia mesmo após interrupção do tratamento. **Conclusão:** Nossos resultados indicam efeito positivo da terapia por vibração de 50Hz, tanto no tecido ósseo como na placa de crescimento de ratos saudáveis em crescimento, que persistiram mesmo após interrupção do tratamento.

Palavras-chave: Vibração; placa de crescimento; tecido ósseo, rato.

Abstract

Albertini-Mariano, S. Effects of vibration therapy on bone and growth plate in growing rats, 2021. 144 f. Dissertation (Master) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2021.

Background: The vibrating platform has been used as a coadjutant in several treatments, as well as in physical training for high sports performance. Vibration therapy as a prophylactic and therapeutic method for osteometabolic disorders has been used by several authors and has shown positive results at improving bone quality. Likewise, results involving increased muscle strength and power also contribute to the greater dissemination and use of the vibrating platform, including treatment at growing ages. However, there is a lack in literature associating the effects of vibration to the growth plate, which may be harmful. In addition, there is not enough consensus and knowledge about the different parameters of the vibrating platform and its effects on bone and growth plate. **Purposes:** To compare different frequency protocols of vibrating platform on the bone tissue and growth plate in healthy growing rats, and to analyze the delayed effects on its interruption. **Materials and Methods:** 72 male rats weighing 120 grams (± 10 g) were randomly assigned into three groups ($n=24/\text{group}$): (1) Sham: sham rats, with no use of vibration; (2) VT 5Hz: rats submitted to vibration therapy with 5Hz in frequency and; (3) VT 50Hz: rats submitted to vibration therapy with 50Hz in frequency. Each group was divided into two subgroups ($n=12/\text{subgroup}$), according to the experimental period. In one subgroup (4w) the animals were subjected to vibration (or sham) for 4 weeks, and in another subgroup (16w) the animals were also subjected to vibration (or sham) for the same 4 weeks, but the sham-follow-up persisted for other 12 weeks, totaling 16 weeks. At the end of the experimental period, the animals were euthanized to collect and analyze the bone tissue at the femurs, tibias, vertebrae and calvarias and the growth plate at the tibias. Bone and growth plate quality was assessed by macroscopic, densitometric, microtomographic, mechanical, and histomorphometric analysis. **Results:** Positive effects on bone and growth plate were evidenced in response to 50Hz vibration therapy. With this protocol it was possible to observe an increase in bone mineral density, bone mineral content and in several formation-related microtomographic parameters (TV, BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Ct.TV, Ct.BV, Ct.BV/TV and Ct.Th), concomitant to the reduction in resorption-related parameters (Tb.Sp, BS/BV and SMI) in femurs and tibiae. Histological analyzes corroborate the previous findings and also show an important osteogenic and chondrogenic effect due to 50Hz vibration therapy. As of note, we detected an increase in the number of trabeculae with a greater amount of osteocytes, thicker trabeculae, an improvement in the organization of cell columns and increased stimulation of the proliferative zone in the growth cartilage. Positive effects were also detected by our mechanical analysis, in which higher resistance were found in the 50Hz vibrated rats. In addition, the beneficial effects of this vibration protocol persisted at a late stage, even after its interruption. On the other hand, the frequency of 5Hz did not show positive effects on bone and cartilaginous tissue, and in some analyzes it was possible to detect negative effects (macroscopic analysis, bone mass, trabecular and cortical microstructural parameters and mechanical test), which persisted late even after interruption of the treatment. **Conclusion:** our findings suggest beneficial effects of the 50Hz vibration therapy, both at the bone tissue and at the growth plate in healthy growing rats, independent of the interruption in its use.

Keywords: Vibration; growth plate; bone tissue, rat.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secção microscópica longitudinal da placa de crescimento proximal da tíbia de rato 1. Zona de repouso. 2. Zona proliferativa. 3. Zona hipertrófica. 4. Zona calcificada 5. Zona ossificação (Hematoxilina e eosina, 200x).	34
Figura 2 – Ramificação e determinação dos grupos e subgrupos utilizados.	47
Figura 3 – Desenho experimental do estudo.	47
Figura 4 - Plataforma vibratória confeccionada no laboratório de Bioengenharia da FMRP utilizada na terapia por vibração.	48
Figura 5 – Medição das tíbias direitas.	49
Figura 6 – Posicionamento dos ossos para exame de densitometria óssea.	50
Figura 7 - Exame de densitometria óssea. No detalhe temos a tíbia escaneada e a região de interesse (metáfise proximal) em destaque.	51
Figura 8 – Figura ilustrativa da seleção da região trabecular de interesse na região proximal da tíbia a ser analisada por microtomografia computadorizada.	53
Figura 9 – Figura ilustrativa da seleção da região trabecular de interesse na vértebra a ser analisada por microtomografia computadorizada.	53
Figura 10 – Figura ilustrativa da seleção da região cortical de interesse na região diafisária da tíbia a ser analisada por microtomografia computadorizada.	54
Figura 11 – A: Imagens dos ossos de fêmur, tíbia e vértebra (da esquerda para direita, respectivamente) do grupo Sham (4s) coradas com picrosirius red para análise dos colágenos. B: Imagens dos ossos de fêmur, tíbia e vértebra (da esquerda para direita, respectivamente) do grupo Sham (16s) coradas com TRAP para análise da atividade osteoclástica (marcações em vermelho e indicadas por setas).	56
Figura 12 – Seleção manual para determinar as áreas das zonas da cartilagem de crescimento. Na figura a área hipertrófica da cartilagem está delimitada pelo contorno amarelo. Cartilagem da tíbia do grupo Sham (4s).	57
Figura 13 – Seleção manual para determinar a espessura da cartilagem de crescimento. Na figura temos a demarcação do início da zona de repouso e que se estende por toda a cartilagem de crescimento até o final da zona calcificada. Cartilagem da tíbia do grupo Sham (4s).	58
Figura 14 – Seleção manual para determinar a contagem de células hipertróficas (pontos amarelos) e calcificadas (pontos magentos destacados pelas setas) da cartilagem de crescimento. Na caixa ao lado da figura temos a quantidade de cada célula. Cartilagem da tíbia do grupo Sham (4s).	59
Figura 15 – Imagens com aumento de 400x das cartilagens de crescimento do fêmur, tíbia e vértebra (da esquerda para direita) do grupo Sham (4s), coradas com picrosirius red e análise do colágeno total. Lista gerada pelo programa Axionvision®.	60

Figura 16 – Imagens representativas dos testes mecânicos realizados nos fêmures (flexão de três pontos – A), nas tíbias (cisalhamento da placa de crescimento – B) e nas vértebras (compressão – C).	61
Figura 17 – Tibia inserida em bloco cilíndrico de resina e acessório metálico em formato de estribo.	61
Figura 18 – Curva de massa corporal semanal dos animais do grupo 4 semanas. Sham: grupo placebo da vibração; TV 5Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 5Hz; e TV 50Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 50Hz.	64
Figura 19 – Curva de massa corporal semanal dos animais do grupo 16 semanas. Embora tenha havido pequena diminuição no ganho de massa corpórea nos animais do grupo TV 5Hz comparado com os grupos Sham e TV 50hz, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Sham: grupo placebo da vibração; TV 5Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 5Hz; e TV 50Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 50Hz.	65
Figura 20 – Curva de comprimento tibial semanal dos animais do grupo 4 semanas. Embora o crescimento das tíbias dos animais Sham seja maior que dos animais submetidos à vibração a partir da segunda semana, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Sham: grupo placebo da vibração; TV 5Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 5Hz; e TV 50Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 50Hz.	66
Figura 21– Curva de comprimento tibial semanal dos animais do grupo 16 semanas. No intervalo entre a quarta e a sexta semana o crescimento das tíbias dos animais do grupo TV 5Hz foi inferior aos demais grupos (Sham e TV 50Hz), porém sem diferença significativa ($p>0,05$). O crescimento foi normalizado após a sexta semana. Sham: grupo placebo da vibração; TV 5Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 5Hz; e TV 50Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 50Hz.	67
Figura 22 – Gráficos com dados do comprimento, perimetria da diáfise, metáfises proximal, metáfise distal e massa dos fêmures dos grupos experimentais de 4 semanas (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores àqueles do grupo TV 50Hz tanto na diáfise ($p=0,01$) como nas metáfises proximal e distal ($p<0,01$); além de valores inferiores aos do grupo Sham nas metáfises proximal ($p=0,01$) e distal ($p=0,02$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação ao comprimento e massa femorais. B: O grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores de comprimento femoral comparados ao grupo Sham ($p=0,01$). Por outro lado, o grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores de perimetria metafisária proximal em comparação aos grupos Sham e TV 5Hz ($p<0,01$). Quanto à massa femoral, o grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores em comparação ao grupo Sham ($p=0,04$) e superiores em relação ao grupo TV 50Hz ($p=0,02$).	68
Figura 23 – Gráficos com dados do comprimento, perimetria da diáfise, metáfises proximal e distal e massa das tíbias dos grupos experimentais de 4 semanas (A) e 16 semanas (B). A: Não foi observada diferença significativa entre os grupos neste período. B: Foi observado valores inferiores da metáfise proximal no grupo TV 5Hz ($p=0,03$) em relação ao grupo Sham.	69
Figura 24 – Gráficos com dados do comprimento, largura e massa das vértebras dos grupos experimentais de 4 semanas (A) e 16 semanas (B). A: Não foi observada diferença significativa	

entre os grupos com relação ao comprimento vertebral. Os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) apresentaram valores inferiores de largura em relação ao grupo Sham ($p<0,04$). O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores aos grupos Sham e TV 50Hz com relação à massa vertebral ($p<0,01$). B: Também não foi observada diferença estatística com relação ao comprimento das vértebras, no entanto, com relação à largura e massa vertebral, o grupo TV 5Hz apresentou resultados inferiores àqueles dos grupos Sham e TV 50Hz ($p<0,01$). Ainda com relação à massa vertebral, os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) apresentaram valores inferiores ao grupo Sham ($p<0,01$).
.....70

Figura 25 – Gráficos com dados do comprimento, largura e massa dos ossos parietais dos grupos experimentais de 4 semanas (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz apresentou valor inferior de comprimento em relação ao grupo Sham e ao grupo TV 5Hz ($p<0,01$); e valor inferior de massa parietal em comparação ao grupo TV 5Hz ($p=0,04$). B: Não foi observada diferença significativa entre os grupos.71

Figura 26 – Gráficos com dados de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo) dos fêmures dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). Não houve diferença significativa na DMO e CMO nas diáfises femorais em ambos os seguimentos. A e B: Valores inferiores de DMO e CMO foram detectados na metáfise distal do grupo TV 5Hz em relação ao grupo Sham ($p<0,01$). Além disso, o grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de DMO e CMO quando comparado ao grupo TV 5Hz ($p<0,01$).72

Figura 27 – Gráficos com dados de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo) das tíbias dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Na região diafisária das tíbias, o grupo TV 5Hz apresentou os menores valores de DMO ($p=0,04$ e $p<0,01$) comparado a Sham e TV 50Hz, respectivamente; além de menor valor de CMO ($p<0,01$) comparado a TV 50Hz. O grupo TV 50Hz exibiu maiores valores de DMO e CMO ($p=0,01$ e $p<0,01$) em comparação aos grupos Sham e TV 5Hz, respectivamente. Na região proximal das tíbias houve redução da DMO e CMO ($p<0,01$) para o grupo TV 5Hz em relação aos grupos Sham e TV 50Hz. B: O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de DMO ($p=0,02$) e CMO ($p=0,01$) na diáfise tibial quando comparado ao grupo Sham.
.....73 e 74

Figura 28 – Gráficos com dados de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo) das vértebras lombares dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos seguido por quatro semanas. B: TV 50Hz apresentou valores menores de DMO e CMO ($p=0,02$) comparado ao Sham, assim como, DMO ($p=0,03$) e CMO ($p=0,02$) comparado a TV 5Hz.74 e 75

Figura 29 – Gráficos com dados da DMO (densidade mineral óssea) e do CMO (conteúdo mineral ósseo) dos ossos parietais dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). Ambos os tempos de seguimento não apresentaram diferenças significativas.75

Figura 30 – Imagens microtomográficas dos fêmures (A), tíbias (B) e vértebras (C) no plano frontal.76

Figura 31 – Gráficos com parâmetros microestruturais trabeculares dos fêmures obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de BV/TV ($p=0,01$) e Tb.N ($p=0,02$) que o grupo TV 5Hz. B: O grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de BV ($p=0,04$) e BV/TV ($p=0,01$) que o grupo TV 5Hz.77 e 78

Figura 32 – Gráficos com parâmetros microestruturais trabeculares das tíbias obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz exibiu maiores valores de BV, BV/TV e Tb.N ($p<0,01$), concomitante a menores valores de SMI e Tb.Sp ($p<0,01$) em comparação ao grupo TV 5Hz. B: Nos grupos seguidos por dezesseis semanas não houve diferença significativa entre os grupos.79 e 80

Figura 33– Gráficos com parâmetros microestruturais trabeculares das vértebras obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O TV 5Hz exibiu menores valores de BV/TV em comparação ao grupo Sham e de ConnD em relação ao grupo TV 50Hz ($p=0,01$ e $p<0,01$, respectivamente). B: Nos grupos seguidos por dezesseis semanas não houve diferença significativa entre os grupos.81 e 82

Figura 34– Gráficos com parâmetros microestruturais trabeculares dos ossos parietais obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nos grupos seguidos por quatro semanas não houve diferença significativa entre os grupos. B: O grupo TV50Hz apresentou valor superior de Tb.N em comparação ao grupo ($p<0,01$).83 e 84

Figura 35 – Gráficos com parâmetros microestruturais corticais de fêmures obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não houve diferença significativa. B: No período de dezesseis semanas, o grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de Ct.BV ($p\leq 0,01$) comparado aos grupos Sham e TV 50Hz, respectivamente.85

Figura 36 – Gráficos com parâmetros microestruturais corticais das tíbias obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de Ct.BV ($p=0,03$) em comparação ao grupo Sham. B: O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de Ct.BV ($p=0,01$) comparado a Sham e TV 50Hz respectivamente, e de Ct.BV/TV ($p=0,04$) em comparação ao grupo TV 50Hz.85 e 86

Figura 37 – Cortes histológicos dos fêmures no plano frontal, corados com H.E. (Hematoxilina-eosina) e aumento de 50x. A: Nos grupos seguidos por 4semanas, a terapia por vibração de 50Hz promoveu aumento na quantidade e espessura das trabéculas ósseas. B: Nos grupos seguidos por 16 semanas é possível observar efeito osteogênico tardio decorrente da vibração de 50Hz, com manutenção do maior volume e espessura das trabéculas ósseas.87

Figura 38 – Cortes histológicos das tíbias no plano frontal, corados com H.E. (Hematoxilina-eosina) e aumento de 50x. A: Nos grupos seguidos por 4 semanas, a terapia por vibração de 50Hz promoveu aumento na quantidade e espessura das trabéculas ósseas. B: Nos grupos seguidos por 16 semanas é possível observar efeito osteogênico tardio decorrente da vibração de 50Hz, com manutenção do maior volume e espessura das trabéculas ósseas.88 e 89

Figura 39– Gráficos com quantificação de colágeno tipo 1 do tecido ósseo de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com picosírius red nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nos fêmures o grupo TV 50Hz exibiu valores superiores que os grupos Sham e TV5Hz ($p=0,02$). B: Houve diferença significativa em todos os ossos analisados. Nos fêmures e nas tíbias, os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram valores superiores que no grupo

Sham ($p<0,01$). Nas vértebras, o grupo TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno que o grupo Sham ($p<0,01$).90

Figura 40 – Gráficos com quantificação de colágeno tipo 3 do tecido ósseo de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com picrosirius red nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nos fêmures, o grupo TV 5Hz exibiu valor superior em comparação ao grupo Sham ($p=0,02$). Nas tíbias, o grupo TV50Hz apresentou maiores valores em Sham ($p=0,01$). Nas vértebras, o grupo TV5Hz exibiu maiores valores que Sham ($p<0,01$) e que TV50Hz ($p<0,01$). B: Nos fêmures e tíbias, o grupo Sham exibiu maiores valores que os grupos TV5Hz ($p<0,01$) e TV50Hz ($p<0,02$).90 e 91

Figura 41 – Gráficos com quantificação de colágeno total do tecido ósseo de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com picrosirius red nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não houve diferença significativa nos grupos seguidos por quatro semanas. B: Houve diferença significativas nos fêmures e vértebras, com maior deposição de colágeno nos grupos TV5Hz ($p<0,01$) e TV50Hz ($p<0,04$) em comparação ao grupo Sham.91 e 92

Figura 42 – Gráficos com quantificação da atividade osteoclástica do tecido ósseo de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com TRAP dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Apenas os fêmures apresentaram diferença significativa, onde TV5Hz ($p=0,04$) exibiu valor maior que Sham. B: Nos fêmures TV5Hz ($p=0,02$) apresentou maior valor comparado ao grupo TV50Hz.92 e 93

Figura 43 – Cortes histológicos dos fêmures no plano frontal, corados com H.E. (Hematoxilina-eosina) e magnificação de 100x. A: Nos grupos seguidos por 4 semanas, a terapia por vibração de 50Hz manteve a organização vertical das células da cartilagem de crescimento com menor infiltração entre as colunas celulares. Por outro lado, a terapia por vibração de 5Hz resultou em desorganização celular e aumento na infiltração entre as colunas celulares. B: Nos grupos seguidos por 16 semanas, o grupo 5Hz exibiu menor espessura da cartilagem. Já o grupo 50Hz apresentou maior espessura da cartilagem que TV 5Hz, além de aumento na zona de ossificação.94

Figura 44 – Cortes histológicos das tíbias no plano frontal, corados com H.E. (Hematoxilina-eosina) e magnificação de 100x. A: Nos grupos seguidos por quatro semanas, ambas frequências (5 e 50Hz) reduziram a espessura da cartilagem. A terapia por vibração de 50Hz reduziu o infiltrado celular e melhorou a organização vertical das células da cartilagem de crescimento. B: Nesse seguimento as vibrações (5 e 50Hz) melhoraram a organização celular e reduziram a espessura e a zona proliferativa.95

Figura 45 – Gráficos com quantificação de colágeno tipo 1 da cartilagem de crescimento de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com picrosirius red nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno tipo 1 nas tíbias e vértebras ($p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente), em comparação com o grupo Sham. B: Nos fêmures, os grupos TV5Hz e TV50Hz apresentaram maior deposição de colágeno que o grupo Sham ($p<0,01$ em ambos). Nas tíbias, o grupo TV5Hz apresentou valores superiores aos grupos Sham ($p<0,01$) e TV50Hz ($p=0,02$). Nas vértebras, os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram maiores valores ($p<0,01$ e $p=0,02$, respectivamente) que no grupo Sham.96

Figura 46 – Gráficos com quantificação de colágeno tipo 3 da cartilagem de crescimento de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com *picrosirius red* nos

grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nos fêmures, TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno tipo 3 que os grupos Sham ($p=0,01$) e TV50Hz ($p=0,03$). Nas vértebras, TV5Hz também apresentou valores superiores em relação ao grupo Sham ($p<0,01$). B: Nos fêmures, os grupos TV5Hz e TV50Hz apresentam valores superiores que no grupo Sham ($p<0,01$).97

Figura 47 –Gráficos com quantificação de colágeno total da cartilagem de crescimento de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com picrosirius red nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nas vértebras, TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno que no grupo Sham ($p<0,01$). B: Nos fêmures, TV5Hz exibiu valores superiores que Sham ($p<0,01$). Nas tíbias, TV5Hz apresentou maiores valores em comparação aos grupos Sham e TV50Hz ($p=0,02$). Nas vértebras, os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram maior deposição de colágeno que no grupo Sham ($p<0,01$).98

Figura 48– Gráficos com valores das medidas da espessura da cartilagem de crescimento dos fêmures dos grupos experimentais seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz exibiu valores superiores ao grupo Sham ($p=0,02$). B: O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores ao grupo Sham ($p=0,01$).99

Figura 49 – Gráficos com valores das medidas da espessura da cartilagem de crescimento das tíbias dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores ao grupo Sham ($p<0,01$). B: O grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores ao grupo Sham ($p=0,03$).99

Figura 50 – Gráficos com valores das medidas da área total (AT), da área da zona proliferativa (ZP) e da área da zona hipertrófica (ZH) da cartilagem de crescimento dos fêmures dos grupos seguidos por quatro (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores de AT ($p<0,01$), ZP ($p=0,01$) e ZH ($p<0,01$) em comparação ao grupo Sham. B: O grupo 5Hz exibiu menores valores em AT ($p=0,04$) e ZH ($p<0,01$) e 50Hz apresentaram valores inferiores de AT e ZH ambos comparados ao grupo Sham ($p\leq 0,01$).100

Figura 51 – Gráficos com valores das medidas da área total (AT), da área da zona proliferativa (ZP) e da área da zona hipertrófica (ZH) da cartilagem de crescimento das tíbias dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: o grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores de AT ($p=0,03$) e ZH ($p<0,01$) que o grupo Sham. O grupo TV 5Hz apresentou valores superiores de AT ($p=0,01$) e ZH ($p=0,02$) que o grupo TV 50Hz. B: o grupo TV 50Hz apresentaram valores inferiores de AT ($p=0,02$) e ZP ($p<0,01$) que o grupo Sham. O grupo TV 5Hz também exibiu valores inferiores de AT ($p=0,01$) em comparação ao grupo Sham.101

Figura 52 – Gráficos expressam a quantidade de células hipertróficas (CH) e calcificadas (CC) da cartilagem de crescimento de fêmures dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz apresentou menor quantidade de CH que o grupo Sham ($p=0,01$). B: Não houve diferença entre os grupos.102

Figura 53 – Gráficos expressam a quantidade de células hipertróficas (CH) e calcificadas (CC) da cartilagem de crescimento de tíbias dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) exibiram menores quantidades de CH ($p=0,03$ e $p<0,01$, respectivamente) que no grupo Sham. B: Os grupos submetidos à vibração exibiram maiores quantidades de CH ($p=0,01$ e $p<0,01$) comparado ao grupo Sham ($p<0,01$).102

Figura 54– Gráficos expressam os valores da força máxima e da rigidez relativa dos fêmures submetidos ao teste mecânico de flexão de três pontos dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, entretanto TV 50Hz exibiu valores superiores que Sham e TV 5Hz tanto na força máxima como na rigidez. B: TV 5Hz e TV 50Hz apresentaram valores superiores de força máxima e rigidez relativa comparados ao grupo Sham ($p<0,0001$).	103 e 104
Figura 55 – Gráficos expressam os valores da força máxima e da rigidez das tíbias submetidas ao teste mecânico de cisalhamento dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). Não houve diferença significativa entre os grupos examinados.	104
Figura 56 – Gráficos expressam os valores da força máxima e da rigidez nas vértebras submetidas ao teste mecânico de compressão dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. B: Os grupos TV 5Hz e TV 50Hz exibiram maiores valores de rigidez que o grupo Sham ($p<0,01$).	105

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão dos animais em grupos experimentais de acordo com o tratamento/procedimento proposto.	46
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
AT	Área total da cartilagem de crescimento
BS/BV	Razão da superfície óssea pelo volume ósseo
BV	Volume ósseo total
BV/TV	Volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas
CC	Células calcificadas
CH	Células hipertróficas
CMO	Conteúdo mineral ósseo
Conn.D	Densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas
Ct.BV	Volume ósseo total cortical
Ct.BV/TV	Volume ocupado pela cortical
Ct.Th	Espessura cortical
Ct.TV	Volume total cortical
DMO	Densidade mineral óssea
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Es.AT	Espessura da área total da cartilagem de crescimento
FMRP	Faculdade de medicina de ribeirão preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
HE	Hematoxilina-Eosina
μCT	Microtomografia computadorizada
TRAP	fosfatase ácida resistente ao tartarato
Tb.N	Número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido
Tb.Sp	Espaçamento entre as trabéculas ósseas
Tb.Th	Espessuras das trabéculas ósseas
TV	Volume ósseo total
ZH	Área da zona hipertrófica
ZP	Área da zona proliferativa

Lista de Símbolos e Unidades

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
g	Grama
g/cm ³	Grama por centímetro cúbico
Hz	Hertz
Kv	Quilovolt
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm/min	Milímetro por minuto
mm ³	Milímetro cúbico
ms	Metros por segundo
μA	Microampere
n°/mm	Número por milímetro
n° ou n	Número
N	Newtons
N/mm	Newtons por milímetro
rpm	Rotação por minuto
μm	Micrômetro
μm ²	Micrômetro quadrado
ROI	Região de interesse
x	Veze, repetições

Sumário

Sumário

1 INTRODUÇÃO	32
1.1. Placa de Crescimento	32
1.2. Tecido ósseo	35
1.3. Mecanotransdução	37
1.4. Terapia por vibração	37
2. HIPÓTESE	41
3. OBJETIVOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1. Animais Experimentais.....	45
4.2. Grupos Experimentais	45
4.3. Terapia por vibração	48
4.4. Acompanhamento do crescimento individual dos animais.....	48
4.5. Análise da qualidade óssea e da cartilagem de crescimento.....	49
4.6. Análise macroscópica	49
4.7. Densitometria óssea (DXA)	50
4.8. Análise microscópica por microtomografia computadorizada (μCT).....	51
4.8.1. Análise da microarquitetura óssea	52
4.9. Histologia e Histomorfometria do tecido ósseo.....	54
4.9.1. Histomorfometria da cartilagem de crescimento	56
4.10. Análise mecânica	60
4.11. Análise dos resultados.....	62
5. RESULTADOS.....	64
5.1. Massa Corpórea	64
5.2. Curva de crescimento das tíbias	65
5.3. Análise Óssea	67
5.3.1. Análise Macroscópica	67
5.3.2. Análise Densitométrica	71
5.3.3. Análise microscópica por microtomografia computadorizada (μCT).....	75
5.3.5. Análise histológica da cartilagem de crescimento	93
5.3.6. Análise histomorfométrica da cartilagem de crescimento.....	96
5.3.6. Análise mecânica	103
6. DISCUSSÃO	107
7. CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS	116
ANEXO I.....	121

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Durante a fase embrionária, os ossos nos vertebrados, formam-se a partir de condensações celulares mesenquimais também denominados “esqueleto membranoso”, que inicialmente apresentam tamanhos semelhantes, entretanto a taxa de crescimento se dá de acordo com as características intrínsecas de cada tipo de osso (1-4).

O crescimento dos ossos longos ocorre através da atividade da placa de crescimento. Esse processo envolve proliferação, desenvolvimento, hipertrofia, apoptose celular e invasão vascular, regidos por influências fisiológicas (hormonais e vasculares) e físicas (impacto e vibração) (1, 5-8).

Todo corpo é submetido diariamente a vários estímulos, entre eles os mecânicos. Tais estímulos podem ser benéficos ao organismo se mantidos em limites fisiológicos adequados, resultando em aumento no trofismo muscular e no crescimento ósseo saudável (5, 9). Dentre os diversos estímulos físicos, a terapia por vibração, tem sido uma intervenção terapêutica utilizada para tratamentos clínicos, afim de promover redução da dor, aumento de força, potência muscular e de massa óssea (10-16). A terapia por vibração também tem sido amplamente utilizada em estudos experimentais, apresentando resultados satisfatórios para o tecido ósseo em cicatrização ou osteoporótico, mas com resultados inconclusivos no tecido ósseo em fase de maturação esquelética (17-23).

A placa de crescimento possui uma estrutura particularmente delicada. O indivíduo que por algum motivo lesioná-la e ou fraturá-la em decorrência de acidentes ou impactos excessivos, pode apresentar deformação óssea e diminuição do crescimento no membro afetado, sendo necessário passar por vários tipos de tratamentos, entre eles, a correção da lesão por meio cirúrgico. A fratura da placa pode ser tratada com imobilização, porém deve ser acompanhada para prevenção e diminuição dos danos. Sendo assim, a placa de crescimento é uma estrutura importantíssima para o crescimento e desenvolvimento saudável dos ossos longos (24, 25).

1.1. Placa de Crescimento

A placa de crescimento é estrutura ímpar, constituída por tecido cartilaginoso e está localizada nas extremidades dos ossos longos, entre o osso subcondral e o metafisário. Sua

formação se dá por via endocondral, ou seja, aquela que provém de um molde cartilaginoso inicial que é substituído por tecido ósseo trabecular metafisário. Sua função é proporcionar o crescimento, desenvolvimento e angulação correta dos ossos longos (1, 2, 6-8, 25, 26).

Como citado anteriormente, esse crescimento se dá por diversos estímulos, entre eles os hormonais, que desencadeiam várias cascatas de eventos que promovem o aporte de nutrientes e sinalizações necessárias para maior ou menor ativação celular nesse tecido (6, 27, 28). Essas sinalizações também são as responsáveis pelo cessar da cartilagem de crescimento, ou seja, pelo fechamento completo (onde o tecido cartilaginoso é totalmente substituído por tecido ósseo trabecular) que ocorre, em média, por volta dos 20 anos de idade em indivíduos saudáveis (8, 24).

A placa de crescimento é constituída por cartilagem do tipo hialina, que apresenta uma matriz composta por fibrilas de colágeno tipo II, proteoglicanos, ácido hialurônico e glicoproteínas, entre elas a condronectina. Além disso, é formada por células específicas chamadas de condroblastos e condrócitos. Os condroblastos possuem características funcionais específicas para produzirem novos condrócitos e encontram-se mais próximos aos fibroblastos do pericôndrio, camada de tecido conjuntivo que reveste a cartilagem hialina e através da qual o tecido é nutrido. Já os condrócitos, localizados em regiões mais internas da cartilagem, apresentam como características corpo mais arredondado, reúnem-se em grupos isógenos de até oito células e secretam glicoproteínas, proteoglicanos e colágeno, especialmente o do tipo II (1, 6, 7).

Microscopicamente essa cartilagem se divide em zonas ou camadas de células, que sob a influência de sinalizações e hormônios, crescem de acordo com o tempo determinado. Comumente essas camadas são divididas em zonas de repouso, proliferativa, hipertrofiada, calcificada e ossificada (Fig.1) (1, 7, 8, 29).

Figura 1. Secção microscópica longitudinal da placa de crescimento proximal da tíbia de rato 1. Zona de repouso. 2. Zona proliferativa. 3. Zona hipertrófica. 4. Zona calcificada 5. Zona ossificação (Hematoxilina e eosina, 200x).

A zona de repouso é onde encontram-se os condrócitos (pequenos progenitores) que são células redondas com finita capacidade de auto renovação. Na zona proliferativa os condrócitos se organizam em colunas longitudinais e se clonam, nessa fase a proliferação celular é rápida. Já na zona hipertrófica, os condrócitos ficam maiores pela absorção de líquidos da matriz, entre eles glicogênio e lipídios, e podem se diferenciar em osteoblastos ou simplesmente sofrem apoptose. Nesse caso, deixam uma lacuna na estrutura de matriz da cartilagem que será preenchida por células ósseas dando espaço à ação dos primeiros osteoblastos e osteoclastos invasores e o término da apoptose dos condrócitos, dando assim origem à zona de cartilagem calcificada. Finalmente, na zona de ossificação mineralizada ocorre a completa invasão dos tabiques ou lacunas por capilares sanguíneos e células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos e depositam a matriz óssea; essa por sua vez se calcifica e aprisiona os osteoblastos que se transformam finalmente em osteócitos, finalizando a mineralização da antiga matriz cartilaginosa em tecido ósseo (2, 4, 7, 8, 30).

Devido à estrutura, localização e propriedade mecânica mais delicada, qualquer lesão pode resultar em má formação óssea ou deformidades estruturais. A resposta a cada tipo de fratura varia de acordo com a área e extensão afetada, mas de qualquer forma será prejudicial

ao desenvolvimento do indivíduo (24, 25). Essas lesões ou fraturas podem ocorrer em crianças e adultos jovens, sendo que um terço de todas as lesões ocorrem em crianças na fase de crescimento e recebem o nome de Salter-Harris (26).

1.2. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado formado por células ósseas e uma matriz extracelular rica em minerais. Apesar de apresentar características de rigidez, é um tecido dinâmico capaz de crescer e se remodelar de acordo com a necessidade do organismo. É constituído por uma parte mineral formada por fosfatos de cálcio em formato de cristais de hidroxiapatita, que lhe conferem aspecto duro; e uma parte orgânica, a matriz colágena, rica em fibras de colágeno o que lhe permite certa maleabilidade (8, 30).

A ossificação pode ocorrer de duas formas distintas, a intramembranosa e a endocondral. Na ossificação intramembranosa as células mesenquimatosas proliferam-se e diferenciam-se em células osteoprogenitoras e fibroblastos. As células osteoprogenitoras, por sua vez, diferenciam-se em osteoblastos e dão origem a espículas osteóides que se mineralizam e formam uma confluyente rede entrelaçada com cavidades ósseas ocupadas por tecido conjuntivo e hematopoiético recebendo a denominação de osso trabecular imaturo. Na sequência, esse osso primário será reabsorvido pela ação dos osteoclastos e novo tecido será depositado no local dando origem a um osso maduro chamado de lamelar. Já na ossificação endocondral, a formação óssea ocorre a partir de centros de ossificação em molde cartilaginoso no formato similar ao osso final, porém em tamanho menor.

A ossificação em ossos longos tem início no centro primário de ossificação, também chamado de cilindro ou colar ósseo, em que as células mesenquimatosas adjacentes ao pericôndrio sofrem diferenciação tornando-se osteoblastos, que iniciam a produção de matriz orgânica mineralizada. Como consequência, os condrócitos presentes nesse centro sofrem hipertrofia e apoptose celular. As lacunas deixadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos e células indiferenciadas do mesênquima, que se diferenciam em osteoblastos e dão origem ao novo osso. Em seguida, ocorrem os centros secundários de ossificação nas porções distais, epífises do osso neoformado, tendo sua porção central preenchida por medula óssea. Com o crescimento radial desses centros, o tecido cartilaginoso

se reduz em cartilagem articular e de crescimento ou placa epifisária, sendo esta última a responsável pelo crescimento longitudinal nesses ossos (8, 30).

O tecido ósseo tem funções muito importantes, entre elas, suporte para outros tecidos corporais, proteção de órgãos e da medula óssea, servir como alavanca para os movimentos, reservar íons minerais, como fosfato e cálcio, liberando-os à corrente sanguínea quando necessário afim de manter a homeostase do organismo, além de captar e armazenar metais pesados para proteção de outros órgãos (8, 30).

A renovação óssea ocorre ao longo de toda a vida por meio do processo de remodelação. No entanto, o ápice da aquisição de massa óssea ocorre durante o crescimento na puberdade. Diante da senescência, esse tecido sofre mudanças e tende a diminuir sua capacidade de regeneração, resultando em desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Como resultado, ocorre perda de massa óssea (osteopenia), que pode evoluir em osteoporose e aumento na fragilidade óssea (30, 31).

Estruturalmente o tecido ósseo se apresenta em lamelas e trabéculas, que quando mais espaçadas e multidirecionadas caracterizam-se em tecido ósseo esponjoso ou trabecular, encontrado nas epífises dos ossos longos e corpo vertebral. Já, as lamelas que se apresentam justapostas e organizadas caracterizam o tecido ósseo compacto ou cortical, localizados predominantemente nas diáfises de ossos longos (8, 30). Células ósseas especializadas e denominadas osteoclastos, osteoblastos e osteócitos são cruciais para que a microarquitetura óssea permaneça com suas funções de crescimento, absorção, remodelação e manutenção (6, 8, 30).

Os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, amplamente ramificadas, derivadas dos monócitos e estão localizadas na superfície óssea. Sua principal função é de reabsorver o tecido ósseo pela acidificação do local (denominado de lacuna de Howship) e degradar os cristais de hidroxiapatita; em seguida promover a completa degeneração da parte orgânica devido à ação de enzimas proteolíticas (8, 30). Os osteoblastos são células advindas do mesênquima que tem por especialização produzir a matriz óssea rica em minerais e permitir sua mineralização. Além disso, são altamente ativas e localizam-se na superfície óssea. Quando maduras, as células osteoblásticas ficam presas na matriz mineralizada e recebem o nome de osteócitos. Estes, por sua vez, têm a propriedade de captar e transmitir todo estímulo mecânico que o osso recebe, atuando assim como mecanossensores, função essencial para ativação do processo de remodelação óssea. Uma outra propriedade relevante dos osteócitos é o de manter

comunicação com os osteoblastos através de uma rede de canalículos por meio dos seus prolongamentos citoplasmáticos, afim de nutrir todo o tecido ósseo (8, 30, 32).

1.3. Mecanotransdução

Sabe-se que as células ósseas têm a propriedade de manter comunicação umas com as outras com o objetivo de nutrir e manter todo o tecido. Além dessas funções, a interação celular é capaz de reconhecer e distribuir sinais da estimulação mecânica em processo denominado mecanotransdução (32).

É pela mecanotransdução que os sinais da deformação óssea chegam até as células do tecido, de forma que o mesmo não sofra danos. Sabe-se que o osso sofre deformação diariamente e que de 0,04% a 0,3% é decorrente da deambulação. O tecido ósseo é capaz de suportar determinado valor de deformação relativa advinda dos estímulos mecânicos, mas para que suas células sejam estimuladas, é necessário que este valor seja até 100x maior do que o osso suportaria. Sendo assim, o sistema canalicular, onde os osteócitos se encontram, tem a capacidade de amplificar os sinais de deformação, promover a estimulação das células ósseas e não danificar o tecido propriamente dito. Os osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo, ocupando de 90% a 95% do mesmo, e os principais responsáveis por coordenar a remodelação óssea. Por meio da liberação de mediadores bioquímicos, os osteócitos são capazes de regular as atividades dos osteoblastos e osteoclastos. Em resumo, a mecanotransdução envolve reações bioquímicas que ativam desde moléculas da matriz extra e pericelular, unidades de integrinas, chegando ao citoesqueleto e à membrana nuclear. Essas reações podem ou não promover o aumento e ou diminuição da proliferação celular, a inibição da apoptose celular e outros eventos (32, 33).

1.4. Terapia por vibração

A terapia por vibração, sejam eles de ordem clínica ou experimental, apresentam resultados promissores na maioria das investigações, inclusive no tratamento e prevenção da osteoporose (21, 34). A terapia é realizada por meio de plataforma vibratória que oscila em frequência e amplitude pré-determinadas e resulta em resposta celular ao estímulo mecânico, seguindo os princípios da mecanotransdução. Seu mecanismo de ação envolve várias vias que

promovem contrações musculares e vibrações transmitidas aos ossos e cartilagem (33). Como resultado, temos aumento da força muscular, melhora do equilíbrio, da propriocepção e da densidade mineral óssea (16), além de aprimorar o desempenho de potência explosiva em indivíduos fisicamente ativos (10).

A vibração de baixa magnitude e alta frequência é um estímulo mecânico controlado e mostra efeitos satisfatórios no osso, atuando na mineralização, remodelação e na consolidação óssea (19, 35-38).

As aplicações da terapia por vibração começaram com Granville, em 1881, como recurso terapêutico aplicados na medicina e fisioterapia. As respostas à vibração podem ser positivas ou negativas, dependendo do protocolo e parâmetros de aplicação (14).

Clinicamente, a estimulação vibratória quando aplicada em conjunto com esforço voluntário mostrou-se eficaz em melhorar o controle neuromuscular em indivíduos com limitação motora (39, 40). Em estudo feito com voluntários atletas profissionais e atletas amadores, o uso da estimulação vibratória também resultou em aumento na potência muscular (40). Além dos resultados no tecido osteomuscular, a terapia por vibração também atua no controle de dor, depressão e capacidade funcional em pacientes com fibromialgia (16) e em crianças portadoras do Transtorno do Espectro Autista (TEA), nas quais foi possível observar redução de algumas estereotipias possivelmente através da liberação de dopamina em resposta à vibração (41). Resultados positivos também foram observados em meninos hemofílicos tipo A que participaram de programa com diferentes intervenções terapêuticas, associadas ao uso da plataforma vibratória e apresentaram melhora na DMO, na força muscular do quadríceps e na capacidade funcional (15).

Experimentalmente, diversos autores obtiveram resultados positivos com o uso da terapia por vibração no tecido esquelético (18, 19, 21, 34, 37). No entanto, também há resultados com efeitos negativos da vibração em tecidos ósseos e cartilagosos (22, 23, 42), que podem estar relacionados a escolhas inadequadas de parâmetros vibracionais e/ou protocolo de tratamento. Os parâmetros vibracionais são muito divergentes, podendo explicar resultados discrepantes entre os estudos.

Recentemente, o uso da terapia por vibração tem aumentado em diversas áreas e finalidades. Embora haja extensa literatura sobre os efeitos da terapia por vibração no tecido ósseo, não há consenso do impacto desses efeitos diante de diferentes protocolos de aplicação. Além disso, é escassa a literatura discutindo os efeitos da terapia por vibração na cartilagem de

crescimento, que podem ser potencialmente nocivos durante fase de maturação esquelética. Ou seja, há necessidade de estudos adicionais, com objetivo de investigar os efeitos da vibração sobre a cartilagem de crescimento e o tecido ósseo, especialmente na fase de crescimento (infância e adolescência), período crítico para o crescimento e desenvolvimento saudável dos ossos, e sob diferentes protocolos de aplicação.

Hipótese

2. HIPÓTESE

Hipotetiza-se que o estímulo mecânico advindo da terapia por vibração com frequências altas possa ser nocivo à cartilagem de crescimento em fase de maturação esquelética e que frequências mais baixas possam ser protetivas ao tecido cartilaginoso e osteogênica ao tecido ósseo trabecular e cortical.

Hipotetiza-se ainda que os possíveis efeitos nocivos possam persistir em fase tardia mesmo após interrupção no seu uso, resultando, por exemplo, em menor crescimento ósseo.

Objetivos

3. OBJETIVOS

Comparar os efeitos de diferentes protocolos de terapia por vibração no tecido ósseo e na cartilagem de crescimento de animais em fase de maturação esquelética.

Analisar o efeito tardio da interrupção da terapia por vibração na placa de crescimento e tecido ósseo desses animais.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais Experimentais

Foram utilizados 72 ratos da raça *Rattus Norvegicus albinus*, variedade *Wistar Hannover*, com cinco semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e alojados no Biotério do Laboratório de Bioengenharia. Antes do período de experimentação os ratos passaram por ambientação durante uma semana, sem qualquer intervenção. Durante todo o período experimental, eles foram mantidos sem restrição de acesso à água e ração, em temperatura ambiente de 20 a 24°C, com controle de luminosidade (claro/escuro: alternância de 12 horas) e controle da umidade relativa de 45 a 55%.

Todos os procedimentos e recursos utilizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com protocolo nº 085/2018 (Anexo I).

Diariamente foram avaliadas as condições de estresse do animal pela lista estabelecida por Knox et al. 2004, que inclui a inspeção clínica dos seguintes itens: aspecto geral, condição da pelagem, presença ou não de pigmentos de porfirina ao redor dos olhos e focinho (indicativo de estresse em roedores), ingestão de ração e obtenção semanal da massa corpórea, além da observação do comportamento animal (autolimpeza, atividade espontânea, reatividade e sono) (43, 44). Os cuidados diários foram de acordo com o guia para cuidados e uso de animais de laboratório (*Animal models as tools in ethical biomedical research*, edição 2010) (45).

4.2. Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois principais grupos experimentais (4 semanas e 16 semanas) para avaliação do tecido ósseo e cartilaginoso em diferentes fases de maturação esquelética. Em seguida, foram subdivididos em seis grupos experimentais, conforme a exposição (ou não) à terapia por vibração e ao protocolo estabelecido quanto à frequência vibratória (Quadro 1 e Figura 2).

Quadro 1 – Divisão dos animais em grupos experimentais de acordo com o tratamento/procedimento proposto.

Grupo	Abreviatura	Especificações
Placebo vibração 4 semanas	SHAM	Sham 4s (n=12) - Ratos placebo do uso da vibração acompanhados por 4 semanas.
Placebo vibração 16 semanas	SHAM	Sham 16s (n=12) - Ratos placebo do uso da vibração acompanhados por 16 semanas.
Terapia por vibração com 5Hz 4 semanas	TV 5Hz 4s	TV 5Hz 4s (n=12) - Ratos submetidos à terapia por vibração com frequência de 5Hz por 4 semanas.
Terapia por vibração com 5Hz 16 semanas	TV 5Hz 16s	TV 5Hz 16s (n=12) - Ratos submetidos à terapia por vibração com frequência de 5Hz por 4 semanas e acompanhados por mais 12 semanas.
Terapia por vibração com 50Hz 4 semanas	TV 50Hz 4s	TV 50Hz 4s (n=12) - Ratos submetidos à terapia por vibração com frequência de 50Hz por 4 semanas.
Terapia por vibração com 50Hz 16 semanas	TV 50Hz 16s	TV 50Hz 16s (n=12) - Ratos submetidos à terapia por vibração com frequência de 50Hz por 4 semanas e acompanhados por mais 12 semanas.

Figura 2 – Ramificação e determinação dos grupos e subgrupos utilizados.

Setenta e dois ratos foram destinados para este experimento e divididos em dois principais grupos experimentais de acordo com o período de observação e maturação esquelética. Nos grupos de 4 semanas (n=36), os animais foram submetidos à eutanásia com nove semanas de idade, representando fase de crescimento ósseo longitudinal e simulando crianças e/ou adolescentes. Nos grupos de 16 semanas (n=36), os animais foram submetidos à eutanásia com 21 semanas de idade, representando fase de maturação esquelética e simulando adultos. Subsequentemente, cada grupo experimental foi subdividido em outros três grupos (n=12/grupo): Sham, TV 5Hz e TV 50Hz, de acordo com o uso e protocolo da terapia por vibração. A figura 3 apresenta o desenho do estudo.

Figura 3 – Desenho experimental do estudo.

4.3. Terapia por vibração

Os animais dos grupos TV 5Hz e TV 50Hz foram submetidos à terapia por vibração por meio da plataforma vibratória confeccionada pelo Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP, com apoio da Oficina de Precisão do Campus de Ribeirão Preto (34). A plataforma vibratória é composta por um compartimento de acrílico com abertura superior (base de 20 cm por 25 cm e 10 cm de altura) com o fundo formado por uma plataforma com vibração vertical na frequência de 5 Hz ou 50Hz e amplitude de 1 mm. Duas divisórias em acrílico foram incluídas no interior da caixa para permitir o treinamento simultâneo de quatro animais, em compartimentos individuais (Figura 4).

Figura 4 - Plataforma vibratória confeccionada no laboratório de Bioengenharia da FMRP utilizada na terapia por vibração.

A terapia por vibração foi iniciada uma semana após o recebimento dos animais, com sessões de vinte minutos, praticada três vezes por semana por um período total de quatro semanas.

4.4. Acompanhamento do crescimento individual dos animais

Durante todo o período experimental o crescimento individual de cada rato foi acompanhado por meio da obtenção do comprimento das tíbias direitas dos animais, realizada duas vezes por semana. Para isso, o animal foi restrito manualmente e por meio de palpação digital, foi identificada a interlinha articular medial do joelho e a extremidade do maléolo

medial (Figura 5). Com auxílio de paquímetro digital foi obtida a distância entre as duas extremidades (46).

Figura 5 – Medição das tíbias direitas.

Imediatamente após o término dos períodos experimentais e seguindo as normas das Diretrizes em eutanásia da Associação Americana de Medicina Veterinária, os animais foram submetidos à eutanásia via decapitação com posterior coleta sanguínea e dissecação óssea para as análises propostas.

4.5. Análise da qualidade óssea e da cartilagem de crescimento

As tíbias, fêmures, vértebras lombares (L4 e L5) e ossos parietais foram coletados, dissecados e limpos das partes moles para análises macroscópica, densitométrica, microtomográfica, histológica e mecânica. As placas de crescimento das tíbias foram analisadas por meio da histomorfometria e análise mecânica.

4.6. Análise macroscópica

Após a dissecação, as tíbias e fêmures foram submetidos à mensuração do comprimento longitudinal, dos diâmetros das diáfises e metáfises por meio de paquímetro digital da marca Mitutoyo®, com precisão de 0,01 mm, e da massa óssea por meio de balança de precisão da

marca Marte®, modelo AC-2000, com precisão de 0,01 g. Nas vértebras lombares L4, além da massa, os valores de comprimentos verticais (altura) e horizontais (largura) foram mensurados.

4.7. Densitometria óssea (DXA)

A densitometria óssea com dupla emissão de raios X foi realizada no Laboratório de Bioengenharia da FMRP-USP, no densitômetro Lunar DPX-IQ (*Lunar; software version 4.7 e, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom*), por meio do método por absorciometria bifotônica de raio-X (DXA: *Dual-energy X-ray absorptiometry*). As tíbias e fêmures esquerdos, foram posicionados paralelamente um ao outro dentro de um recipiente plástico, e imersos em solução alcoólica 70% com 2,0 cm de profundidade (figura 6). O exame foi realizado por meio de software específico para análise densitométrica do esqueleto apendicular de animais de pequeno porte (Figura 7). A mensuração densitométrica específica foi realizada nas seguintes regiões: metáfise proximal das tíbias e distal dos fêmures, na diáfise de tíbias e fêmures, na região central da vértebra lombar, e nas regiões centrais das calotas cranianas. Para isso, foi utilizada como região de interesse (ROI) áreas quadradas de 0,08 cm² para tíbias, fêmures e parietais e de 0,09 cm² para vértebras. Os valores de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo) foram analisados com base na região de interesse avaliada. O coeficiente de variância foi de 4,5%.

Figura 6 – Posicionamento dos ossos para exame de densitometria óssea.

Figura 7 - Exame de densitometria óssea. No detalhe temos a tíbia escaneada e a região de interesse (metáfise proximal) em destaque.

4.8. Análise microscópica por microtomografia computadorizada (μ CT)

Este método tridimensional permite a caracterização da geometria óssea e densidade mineral óssea, além disso, o μ CT possibilita analisar ossos trabeculares e corticais de forma independente (47). A análise por microtomografia computadorizada foi realizada em microtomógrafo GE Phoenix v|tome|x S240 (Phoenix-micro-CT, German) do Centro para Documentação da Biodiversidade da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, Brasil. Por meio do detector DXR250RT 1000x1000 pixels, os seguintes parâmetros foram selecionados durante a execução do exame: 60Kv, 150 μ A, 1000 projeções com média de quatro exposições de 333ms, garantindo resolução de 16 μ m.

O processamento da imagem e a reconstrução tridimensional foram realizados por meio do *software* GE Phoenix datos|x2. Os softwares utilizados para as análises microtomográficas foram o Data Viewer (Bruker-microCT, versão 1.5.1.2) para adequação do posicionamento do osso analisado. Posteriormente, a análise morfométrica foi realizada através do CTAn (Bruker-microCT, versão 2.2.1).

4.8.1. Análise da microarquitetura óssea

A microarquitetura óssea foi realizada na região metafisária dos ossos longos de fêmures e tíbias isolando apenas o tecido trabecular, nas regiões diafisárias desses ossos, o tecido cortical foi isolado. Nos ossos parietais do crânio a área lamelar e trabecular óssea foi avaliada. Nas vértebras, a região central de osso trabecular foi isolada e analisada.

4.8.1.1. Análise da microarquitetura trabecular dos ossos longos, corpos vertebrais e ossos parietais

Essas análises foram realizadas nos ossos metafisários proximais e distais de tíbias e fêmures respectivamente, imediatamente ao término da cartilagem de crescimento por uma extensão de 3 mm (Figura 8). Nas vértebras a seleção manual do tecido trabecular foi realizada em toda sua extensão, imediatamente adjacente às cartilagens de crescimento (Figura 9).

O osso trabecular foi isolado manualmente do osso cortical através do *software* CTAn, o que possibilitou determinar o melhor *threshold*, com o objetivo de excluir tecido mole e incluir tecido mineralizado. Foi utilizado o mesmo *threshold* para todas as amostras de ossos, mas *thresholds* específicos para avaliar os diferentes locais do tecido, ou seja, um para o osso trabecular e outro para o cortical. Para o osso trabecular foi utilizado *threshold* de 255-118.

Os parâmetros analisados foram: volume total (TV), em mm³; volume ósseo (BV), em mm³; razão de volume ósseo pelo volume total (BV/TV), em %; razão da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV), em 1/mm; índice de modelo estrutural (SMI); espessuras das trabéculas ósseas (Tb.Th), em mm; número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido (Tb.N), em 1/mm; espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em mm e densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas (Conn.D) em 1/mm³.

Figura 8 – Figura ilustrativa da seleção da região trabecular de interesse na região proximal da tíbia a ser analisada por microtomografia computadorizada.

Figura 9 – Figura ilustrativa da seleção da região trabecular de interesse na vértebra a ser analisada por microtomografia computadorizada.

Nos ossos parietais dos crânios, a microarquitetura trabecular foi padronizada na área central do osso parietal direito com ROI retangular (0,31x 0,66mm), desenhado manualmente por uma extensão de 1,44 mm. Os parâmetros analisados foram: BV, BV/TV, BS/BV, SMI, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Conn.D.

4.8.1.3. Análise da microarquitetura cortical

A microarquitetura cortical foi analisada na diáfise da tíbia e do fêmur; 8mm proximal à cartilagem de crescimento proximal e distal, respectivamente, por uma extensão de 2mm (Figura 10). Para o osso cortical foi utilizado *threshold* de 255-120. Os parâmetros avaliados foram volume cortical total (Ct.TV, em mm³), volume ósseo cortical (Ct.BV, em mm³), razão de tecido ósseo cortical pelo volume total (Ct.BV/TV, em %) e espessura cortical (Ct.Th, em mm).

Figura 10 – Figura ilustrativa da seleção da região cortical de interesse na região diafisária da tíbia a ser analisada por microtomografia computadorizada.

4.9. Histologia e Histomorfometria do tecido ósseo

As tíbias e fêmures direitos e as vértebras lombares L5 foram processados no Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto -USP.

Inicialmente, os ossos foram submetidos à fixação química em paraformaldeído 4% por 24 horas, descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético EDTA 10% de 30 a 60 dias, e desidratação em concentrações alcoólicas crescentes de 70% a 100%. Em seguida, foram submetidos à diafanização em xilol e incluídos em blocos de parafina. Os cortes histológicos foram realizados no plano coronal, em cortes semi-seriados (totalizando 24 lâminas por bloco,

sendo 3 cortes por lâmina, a cada 12 cortes os 10 seguintes foram descartados) com espessura de 5 μm . Seis lâminas de cada grupo foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise da cartilagem de crescimento e das trabéculas ósseas. Cortes adjacentes foram corados com *picrosirius red* e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) para análise quantitativa de deposição de colágeno e área de reabsorção óssea, respectivamente.

Para os cortes corados com HE, as análises foram realizadas, de forma padronizada, de 0,25 mm a 1,25 mm tanto distal à cartilagem de crescimento proximal da tíbia, quanto proximal à cartilagem de crescimento distal do fêmur e entre as duas placas terminais na vértebra lombar. As secções foram analisadas sob microscopia de campo brilhante nas regiões de interesse, com ampliações de 50 e 100 vezes em microscópio óptico AxioImager® Z2 (Zeiss, Germany) com câmera digital (Zeiss®), acoplada e pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Para os cortes corados com *picrosirius red* e TRAP, as análises foram realizadas a partir de imagens da região da cartilagem de crescimento e do tecido ósseo neoformado. As imagens para análise dos colágenos tipo I, III e total foram adquiridas sob microscopia com luz polarizada e birrefringência e aumento de 100 vezes com microscópio AxioImager® Z2 (Zeiss, Germany) e câmera digital CCD (AxioCam MRC, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada, pertencente ao Laboratório de Ciências Morfológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, o que permitiu a observação das fibras colágenas nas cores vermelho-alaranjado e verde-amarelado, representando respectivamente os colágenos tipo I e III. A análise quantitativa das fibras colágenas foi realizada com o programa Axiovision®, que capta as diferentes tonalidades de vermelho e verde com a luz polarizada para quantificar a somatória das áreas em μm^2 das diferentes fibras.

Para as análises qualitativas e para a aquisição das imagens coradas com TRAP e subsequente quantificação da atividade osteoclástica, foi utilizado o mesmo microscópio óptico das lâminas coradas com hematoxilina e eosina e uma resolução de 100 vezes. Já a quantificação foi realizada através do *software ImageJ* (NIH, versão 1.52a) e os resultados expressos em porcentagem de área.

Figura 11 – A: Imagens dos ossos de fêmur, tíbia e vértebra (da esquerda para direita, respectivamente) do grupo Sham (4s) coradas com *picrosirius red* para análise dos colágenos. B: Imagens dos ossos de fêmur, tíbia e vértebra (da esquerda para direita, respectivamente) do grupo Sham (16s) coradas com TRAP para análise da atividade osteoclástica (marcações em vermelho e indicadas por setas).

4.9.1. Histomorfometria da cartilagem de crescimento

Para análise histomorfométrica da cartilagem de crescimento, as secções foram analisadas sob microscopia de luz (Axiovert, Carl Zeiss, Alemanha), e as imagens capturadas com uma câmera CCD (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Alemanha) com ampliações de 50 e 100 vezes nos cortes corados com HE e 400 vezes nos cortes corados com *picrosirius red*.

Para análise quantitativa da cartilagem de crescimento coradas com HE foram realizadas três fotografias para cada corte, as quais compreendiam a região do centro, periferia direita e esquerda da cartilagem de crescimento.

As análises quantitativas foram realizadas utilizando o *software ImageJ* (NIH, versão 1.52a) e os seguintes parâmetros foram mensurados: (1) área total da cartilagem de crescimento, em μm^2 ; (2) área da zona proliferativa, em μm^2 ; (3) área da zona hipertrófica (incluindo a

calcificada), em μm^2 ; (4) espessura total da placa epifisária, em μm^2 e (5) contagem de células cartilaginosas.

Já para a análise quantitativa dos colágenos tipo I, III e total da cartilagem de crescimento, foram realizadas uma foto de cada corte compreendendo as mesmas regiões citadas anteriormente para o HE. O programa Axiovision® foi utilizado para quantificar a somatória das áreas em μm^2 das diferentes fibras.

4.9.1.1. Análise da área total da cartilagem e das zonas proliferativa e hipertrófica

Para a mensuração da área total, das zonas proliferativa e hipertrófica (incluindo a calcificada), foi realizada a calibração do *software* para mensuração em μm e em seguida as áreas de interesse foram manualmente selecionadas como na Figura 12.

Figura 12 – Seleção manual para determinar as áreas das zonas da cartilagem de crescimento. Na figura a área hipertrófica da cartilagem está delimitada pelo contorno amarelo. Cartilagem da tíbia do grupo Sham (4s).

4.9.1.2. Análise da espessura da cartilagem de crescimento

A espessura da cartilagem de crescimento, expressa em μm , foi realizada manualmente, a cada 4 cm, por toda sua extensão (Figura 13). Em seguida, a média da espessura foi calculada e utilizada nas comparações.

Figura 13 – Seleção manual para determinar a espessura da cartilagem de crescimento. Na figura temos a demarcação do início da zona de repouso e que se estende por toda a cartilagem de crescimento até o final da zona calcificada. Cartilagem da tíbia do grupo Sham (4s).

4.9.1.3. Contagem de células hipertróficas e calcificadas

A contagem de células hipertróficas e calcificadas foi realizada por toda a extensão da cartilagem de crescimento, utilizando ferramenta específica do *software ImageJ* (NIH, versão 1.52a), que destaca as células já marcadas.

Figura 14 – Seleção manual para determinar a contagem de células hipertróficas (pontos amarelos) e calcificadas (pontos magentos destacados pelas setas) da cartilagem de crescimento. Na caixa ao lado da figura temos a quantidade de cada célula. Cartilagem da tíbia do grupo Sham (4s).

4.9.1.4 Análise da deposição de colágeno na cartilagem de crescimento

Para a quantificação da deposição de colágeno, as imagens com aumento de 400 vezes foram adquiridas e em seguida a cor representativa de cada colágeno foi manualmente selecionada, sendo excluída as demais cores. Em seguida, as mesmas foram analisadas pelo programa Axiovision®, que automaticamente gerou uma lista com os valores das áreas de cada colágeno em μm .

Figura 15 – Imagens com aumento de 400x das cartilagens de crescimento do fêmur, tíbia e vértebra (da esquerda para direita) do grupo Sham (4s), coradas com *picrosirius red* e análise do colágeno total. Lista gerada pelo programa Axionvision®.

4.10. Análise mecânica

Os fêmures esquerdos foram destinados ao ensaio de flexão em três pontos (Figura 16A) realizado em máquina universal de ensaios, com célula de carga de 500 N (EMIC® - 10000N) e velocidade de aplicação de carga de 1mm/min. A carga foi aplicada na região anterior da diáfise femoral, previamente posicionada em dois suportes distais mantendo a região central do osso sem apoio, com vão livre de 16mm.

As tíbias esquerdas foram submetidas ao ensaio mecânico de cisalhamento da placa de crescimento proximal (Figura 16B). Para isso, os ossos foram seccionados na metáfise distal da tíbia de modo a obter espécimes de 26 mm de comprimento. A extremidade distal deste fragmento foi incluída em bloco cilíndrico de resina (polimetilmetacrilato), com comprimento de 19 milímetros, deixando assim 7 mm de osso proximal exposto ao ensaio mecânico. Por meio da inserção centralizada de fio de 0,6 mm de diâmetro e 17 mm de comprimento na epífise

proximal da tíbia, foi aplicada força de cisalhamento através de acessório metálico no formato de estribo (15 mm de abertura e 25 mm de comprimento) acoplado à base móvel da máquina universal de ensaio com a face anterior voltada para cima (Figura 17) (48). A célula de carga foi de 50N, com tempo de acomodação de 10 segundos e velocidade de aplicação de carga de 10mm/min.

As vértebras lombares L4 foram destinadas ao ensaio mecânico de compressão (Figura 16C), para tal foram removidos os elementos vertebrais posteriores e foi realizada a discectomia para manter o paralelismo entre as extremidades dos corpos vertebrais. Foi utilizada célula de carga de 500N, com tempo de acomodação de pré-carga de 30 segundos e velocidade de aplicação de carga de 0,5 mm/min.

Os parâmetros mecânicos analisados foram força máxima (em N) e rigidez relativa (em N.mm).

Figura 16 – Imagens representativas dos testes mecânicos realizados nos fêmures (flexão de três pontos – A), nas tíbias (cisalhamento da placa de crescimento – B) e nas vértebras (compressão – C).

Figura 17 – Tíbia inserida em bloco cilíndrico de resina e acessório metálico em formato de estribo.

4.11. Análise dos resultados

A normalidade das variáveis dependentes foi testada através do teste Shapiro-Wilk. A comparação dos grupos para cada período de seguimento (quatro e dezesseis semanas) foi realizada por meio do One-Way ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey, considerado método que controla o erro tipo 1 nas múltiplas comparações. Para as análises estatísticas o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e o programa utilizado o SPSS (versão 2.0).

Resultados

5. RESULTADOS

Os resultados apresentados nesta dissertação são referentes a 72 animais que iniciaram e finalizaram os experimentos sem qualquer perda, tanto por óbito espontâneo, necessidade de eutanásia ou exclusão.

5.1. Massa Corpórea

As figuras 18 e 19 representam a evolução semanal da massa corpórea dos animais avaliados por quatro e dezesseis semanas, respectivamente, em que os valores estão expressos como média e desvio padrão. A homogeneidade entre os grupos analisados foi garantida no início do experimento, em que não foi possível detectar diferença estatística na comparação entre os grupos Sham, TV5 e TV50Hz ($p>0,05$). Com relação à comparação semanal das massas corpóreas, todos os grupos apresentaram ganho de massa no decorrer do estudo, mas sem apresentar diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Para os grupos seguidos pelo período de quatro semanas (Figura 18), os animais do grupo Sham apresentaram aumento na massa corpórea de 105,52% entre o início e o término do experimento ($p<0,01$). Nos animais do grupo TV 5Hz este aumento foi de 108,20% ($p<0,01$) e nos animais do grupo TV 50Hz foi de 112,63% ($p<0,01$).

Figura 18 – Curva de massa corporal semanal dos animais do grupo 4 semanas. Sham: grupo placebo da vibração; TV 5Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 5Hz; e TV 50Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 50Hz.

Resultados similares foram observados nos grupos de dezesseis semanas (Figura 19), em que os animais do grupo Sham apresentaram aumento na massa corpórea de 344,39% entre o início e o término do experimento ($p<0,01$). Nos animais do grupo TV 5Hz este aumento foi de 264,12% ($p<0,01$) e nos animais do grupo TV 50Hz foi de 273,39% ($p<0,01$). Embora o ganho de massa corpórea tenha sido menor nos animais submetidos à terapia por vibração, não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$).

Figura 19 – Curva de massa corporal semanal dos animais do grupo 16 semanas. Embora tenha havido pequena diminuição no ganho de massa corpórea nos animais do grupo TV 5Hz comparado com os grupos Sham e TV 50Hz, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Sham: grupo placebo da vibração; TV 5Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 5Hz; e TV 50Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 50Hz.

5.2. Curva de crescimento das tíbias

Por meio da mensuração semanal *in vivo* do comprimento das tíbias foi possível estabelecer a curva de crescimento dos animais no decorrer deste estudo (Figuras 20 e 21). Corroborando a homogeneidade da massa corpórea entre os diferentes grupos no início do experimento, também não foi detectada diferença estatística entre os comprimentos das tíbias ($p>0,05$).

Para os grupos seguidos pelo período de quatro semanas (Figura 20), as tíbias dos animais do grupo Sham apresentaram crescimento de 31,96% entre o início e o término do experimento ($p<0,01$). Nos animais do grupo TV 5Hz este crescimento foi de 23,80% ($p<0,01$) e nos animais do grupo TV 50Hz foi de 26,54% ($p<0,01$).

É possível observar que a partir da segunda semana o crescimento das tíbias dos animais não submetidos à vibração passa a ser maior que a dos animais submetidos à vibração, porém sem diferença significativa ($p>0,05$).

Figura 20 – Curva de comprimento tibial semanal dos animais do grupo 4 semanas. Embora o crescimento das tíbias dos animais Sham seja maior que dos animais submetidos à vibração a partir da segunda semana, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Sham: grupo placebo da vibração; TV 5Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 5Hz; e TV 50Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 50Hz.

Para os grupos seguidos pelo período de dezesseis semanas (Figura 21), as tíbias dos animais do grupo Sham apresentaram crescimento de 52,37% entre o início e o término do experimento ($p<0,01$). Nos animais do grupo TV 5Hz este crescimento foi de 47,32% ($p<0,01$) e nos animais do grupo TV 50Hz foi de 49,96% ($p<0,01$).

É possível observar que no intervalo entre a quarta e a sexta semana o crescimento das tíbias dos animais submetidos à vibração com frequência de 5Hz foi inferior que o crescimento nos demais grupos (Sham e TV 50Hz), porém sem diferença significativa ($p>0,05$). Esse resultado é sugestivo do efeito negativo da frequência de vibração de 5Hz na placa de crescimento, que resultou em menor crescimento ósseo durante o tratamento de quatro semanas, persistindo com pico nas duas semanas subsequentes. Após este período houve normalização do crescimento ósseo neste grupo, compatível aos demais grupos.

Figura 21– Curva de comprimento tibial semanal dos animais do grupo 16 semanas. No intervalo entre a quarta e a sexta semana o crescimento das tíbias dos animais do grupo TV 5Hz foi inferior aos demais grupos (Sham e TV 50Hz), porém sem diferença significativa ($p>0,05$). O crescimento foi normalizado após a sexta semana. Sham: grupo placebo da vibração; TV 5Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 5Hz; e TV 50Hz: grupo tratado com terapia por vibração com frequência de 50Hz.

5.3. Análise Óssea

5.3.1. Análise Macroscópica

As figuras 22, 23, 24 e 25 apresentam os resultados gráficos das análises macroscópicas realizadas nos fêmures (Figura 22), nas tíbias (Figura 23), nas vértebras lombares (Figura 24) e nos ossos parietais do crânio (Figura 25), tanto nos grupos de quatro como de dezesseis semanas, respectivamente.

Nos fêmures dos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 22A), não houve diferença com relação ao comprimento e massa. O grupo TV 5Hz exibiu menores valores na perimetria metafisária proximal (-6,94%, $p=0,01$) e distal (-8,63%, $p=0,02$) em comparação ao grupo Sham, e na perimetria diafisária (-10%, $p=0,01$), metafisária proximal (-11,17%, $p<0,01$) e distal (-8,78%, $p<0,01$) em relação ao grupo TV 50Hz.

No seguimento por dezesseis semanas (Figura 22B), o grupo TV 5Hz exibiu menor valor no comprimento dos fêmures comparado ao grupo Sham (-2,93%, $p=0,01$) e o grupo TV 50Hz apresentou menores valores de perimetria metafisária proximal em relação aos grupos Sham (-6,03%, $p<0,01$) e TV 5Hz (-8,44%, $p<0,01$). Com relação à massa femoral, os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) exibiram valores inferiores ao grupo Sham ($p<0,05$). Além disso, o grupo TV 5Hz exibiu menor massa femoral que o grupo Sham (-6,14%, $p=0,04$) e maior massa que o grupo TV 50Hz (+1,86%, $p=0,02$).

Figura 22 – Gráficos com dados do comprimento, perimetria da diáfise, metáfises proximal, metáfise distal e massa dos fêmures dos grupos experimentais de 4 semanas (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores àqueles do grupo TV 50Hz tanto na diáfise ($p=0,01$) como nas metáfises proximal e distal ($p<0,01$); além de valores inferiores aos do grupo Sham nas metáfises proximal ($p=0,01$) e distal ($p=0,02$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação ao comprimento e massa femorais. B: O grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores de comprimento femoral comparados ao grupo Sham ($p=0,01$). Por outro lado, o grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores de perimetria metafisária proximal em comparação aos grupos Sham e TV 5Hz ($p<0,01$). Quanto à massa femoral, o grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores em comparação ao grupo Sham ($p=0,04$) e superiores em relação ao grupo TV 50Hz ($p=0,02$).

Nas tíbias dos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 23A), embora sem diferença significativa com relação ao comprimento, perimetrias e massa, o grupo TV 5Hz exibiu os menores valores em todas as medidas macroscópicas realizadas. Nos grupos de dezesseis semanas (Figura 23B), foi detectada diferença significativa apenas na perimetria da metáfise proximal, em que valores inferiores foram observados no grupo TV 5Hz (-8,63%, $p=0,03$) em comparação ao Sham.

Figura 23 – Gráficos com dados do comprimento, perimetria da diáfise, metáfises proximal e distal e massa das tíbias dos grupos experimentais de 4 semanas (A) e 16 semanas (B). A: Não foi observada diferença significativa entre os grupos neste período. B: Foi observado valores inferiores da metáfise proximal no grupo TV 5Hz ($p=0,03$) em relação ao grupo Sham.

Nas vértebras dos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 24A), não houve diferença com relação ao comprimento, mas foram detectadas diferenças na largura e massa das vértebras. Os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) apresentaram valores inferiores na largura (-13,68%, $p<0,01$ e -8,53%, $p=0,04$, respectivamente) em comparação ao grupo Sham. Quanto à massa vertebral, o grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores em comparação aos grupos Sham (-31,46%, $p<0,01$) e TV 50Hz (-29,69%, $p<0,01$). Nas vértebras dos grupos seguidos por 16 semanas (Figura 24B), também não houve diferença com relação ao comprimento, entretanto o grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores na largura das vértebras comparado aos do grupo Sham (-11,46%, $p<0,01$) e TV 50Hz (-9,89%, $p=0,01$). Quanto à massa vertebral, os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) exibiram valores inferiores ao grupo Sham ($p<0,05$). Além disso, o grupo TV 5Hz exibiu menores valores que Sham (-52,46%, $p<0,0001$) e TV 50Hz (-33,82%, $p<0,0001$).

Figura 24 – Gráficos com dados do comprimento, largura e massa das vértebras dos grupos experimentais de 4 semanas (A) e 16 semanas (B). A: Não foi observada diferença significativa entre os grupos com relação ao comprimento vertebral. Os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) apresentaram valores inferiores de largura em relação ao grupo Sham ($p<0,04$). O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores aos grupos Sham e TV 50Hz com relação à massa vertebral ($p<0,01$). B: Também não foi observada diferença estatística com relação ao comprimento das vértebras, no entanto, com relação à largura e massa vertebral, o grupo TV 5Hz apresentou resultados inferiores àqueles dos grupos Sham e TV 50Hz ($p<0,01$). Ainda com relação à massa vertebral, os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) apresentaram valores inferiores ao grupo Sham ($p<0,01$).

Nos ossos parietais dos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 25A), houve diferença significativa com relação ao comprimento e à massa. Em relação ao comprimento ósseo, o grupo TV 50Hz apresentou valores inferiores àqueles apresentados pelos grupos Sham (-8,59%, $p<0,01$) e TV 5 Hz (-8,40%, $p<0,01$). Quanto à massa parietal, o grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores ao grupo TV 5Hz (-20,23%, $p=0,04$). Nos ossos parietais dos grupos seguidos por 16 semanas (Figura 25B), não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 25 – Gráficos com dados do comprimento, largura e massa dos ossos parietais dos grupos experimentais de 4 semanas (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz apresentou valor inferior de comprimento em relação ao grupo Sham e ao grupo TV 5Hz ($p<0,01$); e valor inferior de massa parietal em comparação ao grupo TV 5Hz ($p=0,04$). B: Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

5.3.2. Análise Densitométrica

A figura 26 apresenta os resultados da densidade mineral óssea (DMO) e do conteúdo mineral ósseo (CMO) nos fêmures. Nos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 26A), não houve diferença significativa na DMO e CMO na diáfise femoral. Entretanto, na metáfise distal observa-se valores inferiores de DMO (-18,60%, $p<0,01$) e de CMO (-20%, $p<0,01$) no grupo TV 5Hz em comparação ao grupo Sham. Por outro lado, o grupo TV 50Hz

apresentou valores superiores ao grupo TV 5Hz, tanto de DMO (+28,57%, $p<0,01$) como de CMO (+37,50%, $p<0,01$). Resultados similares foram detectados nas diáfises femorais dos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 26B), em que não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. Na metáfise distal, o grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de DMO (-14,21%, $p<0,01$) e de CMO (-13,33%, $p<0,01$) em comparação ao Sham. Por outro lado, o grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de DMO (+15,29%, $p<0,01$) e de CMO (+7,69%, $p<0,01$) que o grupo TV 5Hz.

Figura 26 – Gráficos com dados de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo) dos fêmures dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). Não houve diferença significativa na DMO e CMO nas diáfises femorais em ambos os seguimentos. A e B: Valores inferiores de DMO e CMO foram detectados na metáfise distal do grupo TV 5Hz em relação ao grupo Sham ($p<0,01$). Além disso, o grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de DMO e CMO quando comparado ao grupo TV 5Hz ($p<0,01$).

A figura 27 mostra a comparação da densidade mineral óssea (DMO) e do conteúdo mineral ósseo (CMO) nas tíbias. Nos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 27A), o TV5Hz exibiu valores inferiores àqueles apresentados pelo grupo Sham com relação à DMO nas diáfises tibiais (-26,75%, $p<0,01$). Além disso, o grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de CMO (-30,77%, $p<0,01$) àqueles apresentados pelo grupo Sham na região diafisária das tíbias. De forma semelhante, o grupo TV 5Hz também apresentou menores valores de DMO (-22,73%, $p<0,01$) e CMO (-22,22%, $p<0,01$) na metáfise proximal das tíbias, quando comparado ao grupo Sham. Já o grupo TV 50Hz apresentou valores superiores de DMO (+20,77%, $p=0,01$) e CMO (+30%, $p=0,01$) na região diafisária quando comparado ao grupo Sham (+61,18%, $p<0,01$) e ao grupo TV 5Hz (+57,14%, $p<0,01$). De forma semelhante, o grupo TV 50Hz também apresentou maiores valores de DMO (+24,54%, $p=0,06$) e CMO (+22,22%, $p=0,07$) na metáfise proximal das tíbias, quando comparado ao grupo Sham.

Nas tíbias seguidas por dezesseis semanas (Figura 27B) o grupo TV 5Hz também apresentou menores valores de DMO (-12,26%, $p=0,02$) e CMO (-11,76%, $p=0,01$) na diáfise quando comparado ao grupo Sham.

Figura 27 – Gráficos com dados de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo) das tíbias dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Na região diafisária das tíbias, o grupo TV 5Hz apresentou os menores valores de DMO ($p=0,04$ e $p<0,01$) comparado a Sham e TV 50Hz, respectivamente; além de menor valor de CMO ($p<0,01$) comparado a TV 50Hz. O grupo TV 50Hz exibiu maiores valores de DMO e CMO ($p=0,01$ e $p<0,01$) em comparação aos grupos Sham e TV 5Hz, respectivamente. Na região proximal das tíbias houve redução da DMO e CMO ($p<0,01$) para o grupo TV 5Hz em relação aos grupos Sham e TV 50Hz. B: O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de DMO ($p=0,02$) e CMO ($p=0,01$) na diáfise tibial quando comparado ao grupo Sham.

A figura 28 apresenta os dados de densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) das vértebras lombares. Nos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 28A) não foram observadas diferenças significativas em DMO e CMO, entretanto, o grupo TV 5Hz apresentou menores valores que Sham e TV 50Hz. Nos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 28B), o grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores de DMO (-18,31%, $p=0,02$ e -13,86%, $p=0,03$) e CMO (-15,79%, $p=0,02$ e -11,11%, $p=0,02$) em comparação aos grupos Sham e TV 5Hz, respectivamente.

Figura 28 – Gráficos com dados de DMO (densidade mineral óssea) e CMO (conteúdo mineral ósseo) das vértebras lombares dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos seguido por quatro semanas. B: TV 50Hz apresentou valores menores de DMO ($p=0,02$) comparado ao Sham, assim como, DMO ($p=0,03$) e CMO ($p=0,02$) comparado a TV 5Hz.

A figura 29 mostra a comparação da densidade mineral óssea (DMO) e do conteúdo mineral ósseo (CMO) dos ossos parietais no período de quatro semanas (Figura 29A) e dezesseis semanas (Figura 29B), em que não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos.

Figura 29 – Gráficos com dados da DMO (densidade mineral óssea) e do CMO (conteúdo mineral ósseo) dos ossos parietais dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). Ambos os tempos de seguimento não apresentaram diferenças significativas.

5.3.3. Análise microscópica por microtomografia computadorizada (μCT)

A figura 30 apresenta imagens microtomográficas dos fêmures (A), tíbias (B) e vértebras (C) no plano frontal, nos períodos de quatro e dezesseis semanas de seguimento experimental. As imagens apresentam comparações qualitativas com relação à qualidade

óssea decorrente da terapia por vibração. De maneira geral, é possível observar efeito osteogênico importante após tratamento com frequência de 50Hz de vibração. Tanto nos ossos submetidos à descarga total de peso (fêmures e tíbias) como parcial (vértebras) é possível observar aumento no tecido ósseo trabecular e cortical. Esses resultados qualitativos corroboram os achados quantitativos decorrentes da morfometria trabecular e cortical, que serão posteriormente apresentados e discutidos.

Figura 30 – Imagens microtomográficas dos fêmures (A), tíbias (B) e vértebras (C) no plano frontal.

5.3.3.1. Análise da microarquitetura trabecular

As Figuras 31, 32, 33 e 34 apresentam os resultados dos parâmetros microestruturais dos fêmures, tíbias, vértebras e parietais, respectivamente, obtidos pela microtomografia computadorizada. Os gráficos apresentam os valores morfométricos do volume total (TV), em mm^3 ; volume ósseo (BV), em mm^3 ; razão de volume ósseo pelo volume total (BV/TV), em %; razão da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV), em $1/\text{mm}$; índice de modelo estrutural (SMI); espessuras das trabéculas ósseas (Tb.Th), em mm; número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido (Tb.N), em $1/\text{mm}$; espaçamento entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em mm e densidade de conexão entre múltiplas trabéculas ósseas (Conn.D) em $1/\text{mm}^3$.

Com relação à análise microestrutural dos fêmures no período de quatro semanas (Figura 31A), é possível observar que o grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de

BV/TV (+18,74%, $p=0,01$) e Tb.N (+15,97%, $p=0,02$) em comparação ao grupo TV 5Hz. Nos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 31B), o grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de BV (+27,96%, $p=0,04$) e BV/TV (+25,88%, $p=0,01$) em comparação ao grupo TV 5Hz. De maneira geral, o grupo TV 50Hz apresenta tendência uniforme com valores maiores dos parâmetros relacionados à formação óssea (TV, BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.N e Conn.D) e menores valores relacionados à reabsorção óssea (BS/BV, SMI e Tb.Sp) em comparação ao grupo TV 5Hz.

Figura 31 – Gráficos com parâmetros microestruturais trabeculares dos fêmures obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de BV/TV ($p=0,01$) e Tb.N ($p=0,02$) que o grupo TV 5Hz. B: O grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de BV ($p=0,04$) e BV/TV ($p=0,01$) que o grupo TV 5Hz.

Com relação à análise microestrutural das tíbias no período de quatro semanas (Figura 32A), é possível observar que o grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de BV (+49,41%, $p<0,01$), BV/TV (+54,14%, $p<0,01$) e Tb.N (+48,53, $p<0,01$) quando comparado ao grupo TV 5Hz, concomitante a menores valores de SMI (-36,36%, $p<0,01$) e Tb.Sp (-20,97%, $p<0,01$). Os grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 32B) não exibiram diferenças estatísticas.

Figura 32 – Gráficos com parâmetros microestruturais trabeculares das tíbias obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz exibiu maiores valores de BV, BV/TV e Tb.N ($p<0,01$), concomitante a menores valores de SMI e Tb.Sp ($p<0,01$) em comparação ao grupo TV 5Hz. B: Nos grupos seguidos por dezesseis semanas não houve diferença significativa entre os grupos.

Quanto à análise microestrutural das vértebras no período de quatro semanas (Figura 33A), o grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores de BV/TV (-7,57%, $p=0,01$) em relação ao grupo Sham e de Conn.D (-17,94%, $p<0,01$) em comparação ao grupo TV 50Hz. Os grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 33B) não apresentaram diferenças significativas.

Figura 33– Gráficos com parâmetros microestruturais trabeculares das vértebras obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O TV 5Hz exibiu menores valores de BV/TV em comparação ao grupo Sham e de ConnD em relação ao grupo TV 50Hz ($p=0,01$ e $p<0,01$, respectivamente). B: Nos grupos seguidos por dezesseis semanas não houve diferença significativa entre os grupos.

Quanto à análise microestrutural dos ossos parietais no período de quatro semanas (Figura 34A), não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. No entanto, o grupo TV50Hz exibiu maiores valores de BV/TV (+12,91%) e Tb.Th (+10,42%), e valor inferior de SMI (-44,55%) em relação ao grupo Sham, sem diferença significativa ($p > 0.05$). No período de dezesseis semanas (Figura 34B), o grupo TV50Hz (+20,04%, $p < 0.01$) exibiu maiores valores de Tb.N em comparação ao grupo TV5Hz.

Figura 34– Gráficos com parâmetros microestruturais trabeculares dos ossos parietais obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nos grupos seguidos por quatro semanas não houve diferença significativa entre os grupos. B: O grupo TV50Hz apresentou valor superior de Tb.N em comparação ao grupo ($p<0,01$).

5.3.3.2. Análise da microarquitetura cortical

As figuras 35 e 36 exibem os resultados dos parâmetros microestruturais do tecido ósseo cortical dos fêmures e tíbias, respectivamente, obtidos pela microtomografia computadorizada. Os gráficos apresentam os valores morfométricos do volume ósseo cortical (Ct.BV), porcentagem de tecido cortical (Ct.BV/TV) e espessura cortical (Ct.Th).

Com relação à análise microestrutural cortical dos fêmures no período de quatro semanas (Figura 35A) não houve diferença significativa. Nos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 35B), o grupo TV5Hz apresentou menor valor de Ct.BV (-6,61%, $p < 0,01$) em comparação ao grupo Sham, e menores valores de Ct.BV (-4,36%, $p = 0,01$) em comparação ao grupo TV50Hz.

Figura 35 – Gráficos com parâmetros microestruturais corticais de fêmures obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não houve diferença significativa. B: No período de dezesseis semanas, o grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de Ct.BV ($p \leq 0,01$) comparado aos grupos Sham e TV 50Hz, respectivamente.

Com relação à análise microestrutural cortical das tíbias no período de quatro semanas (Figura 36A), o grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores de Ct.BV (-12,56%, $p=0,03$) em comparação ao grupo Sham. Já nos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 36B), o grupo TV 5Hz também apresentou menores valores de Ct.BV (-8,36%, $p=0,01$ e -3,39%, $p=0,01$) comparado a Sham e TV 50Hz respectivamente, e de Ct.BV/TV (-10,85%, $p=0,04$) em comparação ao grupo TV 50Hz.

Figura 36 – Gráficos com parâmetros microestruturais corticais das tíbias obtidos pela microtomografia computadorizada dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de Ct.BV ($p=0,03$) em comparação ao grupo Sham. B: O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de Ct.BV ($p=0,01$) comparado a Sham e TV 50Hz respectivamente, e de Ct.BV/TV ($p=0,04$) em comparação ao grupo TV 50Hz.

5.3.4. Análise histológica e histomorfométrica do tecido ósseo metafisário

As figuras 37 e 38 apresentam imagens histológicas de fêmures e tíbias, respectivamente, de animais seguidos por quatro e dezesseis semanas. Os cortes histológicos foram corados com H.E. para visualização das trabéculas e células ósseas e fotografados com aumento de 50x.

Nos grupos seguidos por quatro semanas, a aplicação da terapia por vibração com frequência de 50Hz proporcionou efeito osteogênico positivo nos fêmures dos animais treinados (Figura 37A). Pode-se inferir que a vibração de 50Hz foi eficaz em estimular a atividade osteoblástica, resultando em maior número e espessura de trabéculas ósseas. Com maiores amplificações, é possível identificar aumento na quantidade de células pré-osteoblásticas e maior quantidade de osteócitos na matriz óssea. Por outro lado, a vibração com frequência de 5Hz resultou em menor quantidade de trabéculas ósseas e de osteócitos, bem como maior espaçamento trabecular.

Na figura 37B é possível observar a manutenção dos ganhos obtidos pela terapia por vibração com frequência de 50Hz nos fêmures dos animais seguidos por 16 semanas, com maior quantidade de tecido trabecular e espessura. A vibração de 5Hz resultou em redução na quantidade e espessura das trabéculas ósseas, bem como em maior espaçamento entre elas e menor quantidade de osteócitos nas trabéculas.

Figura 37 – Cortes histológicos dos fêmures no plano frontal, corados com H.E. (Hematoxilina-eosina) e aumento de 50x. A: Nos grupos seguidos por 4 semanas, a terapia por vibração de 50Hz promoveu aumento na quantidade e espessura das trabéculas ósseas. B: Nos grupos seguidos por 16 semanas é possível observar efeito osteogênico tardio decorrente da vibração de 50Hz, com manutenção do maior volume e espessura das trabéculas ósseas.

Assim como nos fêmures, a aplicação da terapia por vibração com frequência de 50Hz proporcionou efeito osteogênico positivo nas tíbias dos animais treinados e seguidos por quatro semanas (Figura 38A). A vibração de 50Hz resultou aumento no número e espessura de trabéculas ósseas. Por outro lado, a vibração com frequência de 5Hz resultou

em menor quantidade de trabéculas ósseas, redução na espessura e aumento no espaçamento trabecular.

Na figura 38B é possível observar manutenção dos ganhos obtidos pela terapia por vibração com frequência de 50Hz nas tíbias dos animais seguidos por 16 semanas, com maior quantidade de tecido trabecular e espessura. A vibração de 5Hz resultou em redução na quantidade e espessura das trabéculas ósseas, bem como em maior espaçamento entre elas.

Figura 38 – Cortes histológicos das tíbias no plano frontal, corados com H.E. (Hematoxilina-eosina) e aumento de 50x. A: Nos grupos seguidos por 4 semanas, a terapia por vibração de 50Hz promoveu aumento na quantidade e espessura das trabéculas ósseas. B: Nos grupos seguidos por 16 semanas é possível observar efeito osteogênico tardio decorrente da vibração de 50Hz, com manutenção do maior volume e espessura das trabéculas ósseas.

5.3.4.1 Análise quantitativa da deposição de colágeno no tecido ósseo

A coloração *picrosirius red* permitiu a quantificação dos colágenos tipo 1, 3 e total dos ossos de fêmures, tíbias e vértebras através da polarização das imagens de amostras histológicas. As figuras 39, 40 e 41 exibem os gráficos comparativos dos resultados quantitativos dessas análises.

A figura 39 apresenta os resultados percentuais da área de deposição do colágeno tipo 1 no tecido ósseo. Nota-se que nos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 39A) houve diferença significativa apenas nos fêmures, onde os grupos submetidos a vibração de 50Hz exibiram maior quantidade de deposição de colágeno (+242,31%, $p=0,02$ e +239,05%, $p=0,02$), em comparação aos grupos Sham e TV5Hz, respectivamente. Nos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 39B) houve diferença significativa nos fêmures, em que os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram valores superiores em comparação ao grupo Sham (+246,68%, $p<0,0001$ e +190,00%, $p=0,04$). Nas tíbias os resultados foram similares aos fêmures, sendo que os grupos TV5Hz e TV50Hz apresentaram valores maiores aos do grupo Sham (+541,07%, $p<0,01$ e +416,07%, $p<0,01$). Nas vértebras, o grupo TV5Hz exibiu valores superiores que o grupo Sham (+378,82%, $p<0,01$).

Figura 39 – Gráficos com quantificação de colágeno tipo 1 do tecido ósseo de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com *picrosirius red* nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nos fêmures o grupo TV 50Hz exibiu valores superiores que os grupos Sham e TV5Hz ($p=0,02$). B: Houve diferença significativa em todos os ossos analisados. Nos fêmures e nas tíbias, os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram valores superiores que no grupo Sham ($p<0,01$). Nas vértebras, o grupo TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno que o grupo Sham ($p<0,01$).

A figura 40 apresenta os valores do colágeno tipo 3 nos ossos de fêmures, tíbias e vértebras. Nos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 40A) houve diferença significativa em todos os ossos, sendo que aqueles submetidos à terapia por vibração exibiram maior deposição de colágeno que os grupos Sham. Nos fêmures, o grupo TV5Hz exibiu valores superiores em comparação ao grupo Sham (+621,43%, $p=0,02$). Nas tíbias, o grupo TV50Hz exibiu maior deposição de colágeno que o grupo Sham (+146,43, $p=0,01$). Nas vértebras, o grupo TV5Hz exibiu maiores valores (+378,13%, $p<0,01$ e +170,80%, $p<0,01$) que os grupos Sham e TV50Hz, respectivamente. Já nos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 40B) a deposição de colágeno foi maior nos grupos Sham que nos grupos submetidos à terapia por vibração nos fêmures e tíbias. Nos fêmures, o grupo Sham exibiu maiores valores que TV5Hz e TV50Hz (+525%, $p<0,01$ e +222,58%, $p<0,01$, respectivamente). Nas tíbias, o grupo Sham também exibiu maiores valores que TV5Hz e TV50Hz (+1045,45%, $p<0,01$ e +250%, $p=0,02$, respectivamente).

Figura 40 – Gráficos com quantificação de colágeno tipo 3 do tecido ósseo de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com *picrosirius red* nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nos fêmures, o grupo TV 5Hz exibiu valor superior em comparação ao grupo Sham ($p=0,02$). Nas tíbias, o grupo TV50Hz apresentou maiores valores em Sham ($p=0,01$). Nas vértebras, o grupo TV5Hz exibiu maiores valores que Sham ($p<0,01$) e que TV50Hz ($p<0,01$). B: Nos fêmures e tíbias, o grupo Sham exibiu maiores valores que os grupos TV5Hz ($p<0,01$) e TV50Hz ($p<0,02$).

A quantificação do colágeno total apresenta-se nos gráficos da figura 41. Nos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 41A), não houve diferença entre os grupos. No período de dezesseis semanas (Figura 41B) a deposição de colágeno nos fêmures foi maior nos grupos TV5Hz (+72,50%, $p<0,01$) e TV50Hz (+72%, $p=0,04$) em comparação ao grupo Sham. De forma semelhante, a deposição de colágeno nas vértebras também foi superior nos grupos TV5Hz (+115,38%, $p<0,01$) e TV50Hz (+143,20%, $p<0,01$) que no grupo Sham.

Figura 41 – Gráficos com quantificação de colágeno total do tecido ósseo de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com *picrosirius red* nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não houve diferença significativa nos grupos seguidos por quatro semanas. B: Houve diferença significativas nos fêmures e vértebras, com maior deposição de colágeno nos grupos TV5Hz ($p<0,01$) e TV50Hz ($p<0,04$) em comparação ao grupo Sham.

5.3.4.2 Análise quantitativa da área reabsortiva e atividade osteoclástica

A coloração fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é marcador bioquímico de reabsorção óssea e permite marcar, especificamente a atividade osteoclástica, com manchas avermelhadas nas imagens histológicas. A figura 42 apresenta os gráficos com os resultados da atividade osteoclástica em fêmures, tíbias e vértebras.

Nos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 42A) apenas os fêmures apresentaram diferença significativa, em que o grupo TV5Hz exibiu maior atividade osteoclástica (+123,27, $p=0,04$) que o grupo Sham. Os grupos de dezesseis semanas (Figura 42B) exibiram resultados semelhantes aos grupos de quatro, em que os fêmures do grupo TV5Hz apresentaram maior atividade osteoclástica que o grupo TV50Hz (+35,41%, $p=0,02$).

Figura 42 – Gráficos com quantificação da atividade osteoclástica do tecido ósseo de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com TRAP dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Apenas os fêmures apresentaram diferença significativa, onde TV5Hz ($p=0,04$) exibiu valor maior que Sham. B: Nos fêmures TV5Hz ($p=0,02$) apresentou maior valor comparado ao grupo TV50Hz.

5.3.5. Análise histológica da cartilagem de crescimento

As figuras 43 e 44 apresentam imagens histológicas de fêmures e tíbias, respectivamente, coradas com H.E. e aumento de 100 vezes, em que é possível observar a organização celular nas diferentes zonas da cartilagem de crescimento, bem como a espessura e provável apoptose precoce dos condrócitos.

Nos grupos seguidos por quatro semanas, a aplicação da terapia por vibração com frequência de 50Hz proporcionou efeitos condrogênicos positivos nos fêmures dos animais treinados (Figura 43A). A vibração foi eficaz em reduzir a zona de repouso na cartilagem de crescimento concomitante à inibição de apoptose precoce. Por outro lado, a vibração com frequência de 5Hz resultou em desorganização das colunas de células da cartilagem de crescimento, inclusive com infiltração de material entre as colunas celulares.

Nos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 43B), embora a cartilagem de crescimento tenha atividade celular reduzida, a frequência de vibração 5Hz induziu aumento de infiltrado celular e redução da espessura da cartilagem em comparação ao grupo Sham. Já nos animais submetidos à vibração de 50Hz foi possível identificar aumento na espessura da cartilagem de crescimento em comparação ao grupo TV 5Hz e aumento na zona de ossificação, justificando o aumento no volume trabecular metafisário.

Figura 43 – Cortes histológicos dos fêmures no plano frontal, corados com H.E. (Hematoxilina-eosina) e magnificação de 100x. A: Nos grupos seguidos por 4 semanas, a terapia por vibração de 50Hz manteve a organização vertical das células da cartilagem de crescimento com menor infiltração entre as colunas celulares. Por outro lado, a terapia por vibração de 5Hz resultou em desorganização celular e aumento na infiltração entre as colunas celulares. B: Nos grupos seguidos por 16 semanas, o grupo 5Hz exibiu menor espessura da cartilagem. Já o grupo 50Hz apresentou maior espessura da cartilagem que TV 5Hz, além de aumento na zona de ossificação.

Quanto às tíbias seguidas por quatro semanas (Figura 44A), a terapia por vibração (tanto de 5 como 50Hz) resultou em redução da espessura da cartilagem de crescimento das tíbias dos animais treinados em comparação ao grupo Sham. Na comparação entre os

diferentes protocolos de vibração, a frequência de 50Hz resultou em redução no infiltrado celular, além de maior organização nas colunas celulares.

No seguimento de dezesseis semanas (Figura 44B) nota-se que as vibrações geraram melhora na organização das fileiras celulares, reduziram a espessura e a zona proliferativa da cartilagem de crescimento comparado ao grupo Sham.

Figura 44 – Cortes histológicos das tíbias no plano frontal, corados com H.E. (Hematoxilina-eosina) e magnificação de 100x. A: Nos grupos seguidos por quatro semanas, ambas frequências (5 e 50Hz) reduziram a espessura da cartilagem. A terapia por vibração de 50Hz reduziu o infiltrado celular e melhorou a organização vertical das células da cartilagem de crescimento. B: Nesse seguimento as vibrações (5 e 50Hz) melhoraram a organização celular e reduziram a espessura e a zona proliferativa.

5.3.6. Análise histomorfométrica da cartilagem de crescimento

Além dos cortes corados com HE, cortes adjacentes corados com *picrosirius red* foram utilizados para quantificação da área com deposição de colágeno na cartilagem de crescimento. As figuras 45, 46 e 47 exibem os gráficos referentes à deposição de colágenos tipo 1, 3 e total na cartilagem de crescimento de fêmures, tíbias e vértebras, respectivamente.

Na figura 45A, entre os grupos seguidos por quatro semanas, o grupo TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno nas cartilagens de crescimento das tíbias (+183,33%, $p=0,02$) e vértebras (+84,38%, $p=0,01$), em comparação com os respectivos grupos Sham. No seguimento de dezesseis semanas (Figura 45B), foi possível observar maior deposição de colágenos nas cartilagens de crescimento femorais nos grupos TV5Hz e TV50Hz em relação ao grupo Sham (+513,46%, $p<0,01$ e +313,08%, $p<0,01$, respectivamente). Nas tíbias, o grupo TV5Hz apresentou maiores valores que os grupos Sham (+267,57%, $p<0,01$) e TV50Hz (+172%, $p=0,02$). Nas vértebras, os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram maior deposição de colágeno tipo 1 que o grupo Sham (+1220,69%, $p<0,01$ e +617,24%, $p=0,02$, respectivamente).

Figura 45 – Gráficos com quantificação de colágeno tipo 1 da cartilagem de crescimento de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com *picrosirius red* nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno tipo 1 nas tíbias e vértebras ($p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente), em comparação com o grupo Sham. B: Nos fêmures, os grupos TV5Hz e TV50Hz apresentaram maior deposição de colágeno que o grupo Sham ($p<0,01$ em ambos). Nas tíbias, o grupo TV5Hz apresentou valores superiores aos grupos Sham ($p<0,01$) e TV50Hz ($p=0,02$). Nas vértebras, os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram maiores valores ($p<0,01$ e $p=0,02$, respectivamente) que no grupo Sham.

A figura 46 exibe os resultados dos gráficos da quantificação de colágeno tipo 3 nos fêmures, tíbias e vértebras. Nos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 46A) houve diferenças nos fêmures e vértebras. Quanto aos fêmures, o grupo TV5Hz exibiu maior quantidade de colágeno tipo 3 que os grupos Sham e TV50Hz (+244,27%, $p=0,01$ e +175%, $p=0,03$, respectivamente). Nas vértebras, o grupo TV5Hz exibiu valores superiores em comparação ao grupo Sham (+156,85%, $p<0,01$). Já no seguimento de dezesseis semanas (Figura 46B) os grupos TV5Hz e TV50Hz apresentaram maior deposição de colágeno que o grupo Sham nos fêmures (+243,09%, $p<0,01$ e +176,42%, $p<0,01$).

Figura 46 –Gráficos com quantificação de colágeno tipo 3 da cartilagem de crescimento de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com *picrosirius red* nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nos fêmures, TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno tipo 3 que os grupos Sham ($p=0,01$) e TV50Hz ($p=0,03$). Nas vértebras, TV5Hz também apresentou valores superiores em relação ao grupo Sham ($p<0,01$). B: Nos fêmures, os grupos TV5Hz e TV50Hz apresentam valores superiores que no grupo Sham ($p<0,01$).

A quantificação do colágeno total da cartilagem de crescimento dos ossos de fêmures, tíbias e vértebras, estão descritos nos gráficos da figura 47.

Dos grupos seguidos por quatro semanas (Figura 47A), apenas as vértebras exibiram diferença significativa, em que TV5Hz apresentou maior quantidade total de colágeno (+95,02%, $p<0,01$) comparado ao grupo Sham. No seguimento de dezesseis semanas (Figura 47B), o grupo TV5Hz apresentou valores superiores que o grupo Sham nos fêmures (+155,45%, $p<0,01$). Nas tíbias, o grupo TV5Hz também exibiu maiores valores em relação aos grupos Sham e TV50Hz (+76,83%, $p=0,02$ e +78,17%, $p=0,02$, respectivamente). Nas vértebras, os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram maior deposição de colágeno total que no grupo Sham (+208,92%, $p<0,01$ e +220,38%, $p<0,01$).

Figura 47 – Gráficos com quantificação de colágeno total da cartilagem de crescimento de fêmures, tíbias e vértebras obtidos por imagens histológicas coradas com *picrosirius red* nos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Nas vértebras, TV5Hz apresentou maior deposição de colágeno que no grupo Sham ($p<0,01$). B: Nos fêmures, TV5Hz exibiu valores superiores que Sham ($p<0,01$). Nas tíbias, TV5Hz apresentou maiores valores em comparação aos grupos Sham e TV50Hz ($p=0,02$). Nas vértebras, os grupos TV5Hz e TV50Hz exibiram maior deposição de colágeno que no grupo Sham ($p<0,01$).

5.3.6.1. Análises da espessura da cartilagem de crescimento

As figuras 48 e 49 apresentam os resultados referente à espessura da cartilagem de crescimento dos fêmures e tíbias, respectivamente.

Nos fêmures seguidos por quatro semanas (Figura 48A), o grupo TV 50Hz apresentou cartilagens de crescimento com maior espessura que o grupo Sham (+15,36%, $p=0,02$). No período de dezesseis semanas (Figura 48B), os grupos submetidos à vibração apresentaram menor espessura de cartilagens que o grupo Sham, sendo que o grupo TV 5Hz exibiu valor significativamente menor de espessura quando comparado ao grupo Sham (-35,36%, $p=0,01$).

Figura 48– Gráficos com valores das medidas da espessura da cartilagem de crescimento dos fêmures dos grupos experimentais seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz exibiu valores superiores ao grupo Sham ($p=0,02$). B: O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores ao grupo Sham ($p=0,01$).

Nas tíbias seguidas por quatro semanas (Figura 49A), o grupo TV 50Hz apresentou cartilagens de crescimento com menor espessura que o grupo Sham (-19,57%, $p<0,01$). No período de dezesseis semanas (Figura 49B), o grupo TV 50Hz persistiu exibindo cartilagens de crescimento com menores valores de espessura quando comparado ao grupo Sham (-28,69%, $p=0,03$).

Figura 49 – Gráficos com valores das medidas da espessura da cartilagem de crescimento das tíbias dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores ao grupo Sham ($p<0,01$). B: O grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores ao grupo Sham ($p=0,03$).

5.3.6.2. Análises da área total e das zonas proliferativa e hipertrófica (incluindo a calcificada)

As figuras 50 e 51 exibem os resultados das análises quantitativas, dos fêmures e tíbias, respectivamente. Os gráficos representam os valores das médias da área total da cartilagem de crescimento (AT), da área da zona proliferativa (ZP) e da área da zona hipertrófica (ZH).

Nos fêmures seguidos por quatro semanas (Figura 50A), o grupo TV 50Hz apresentou valores inferiores de AT (-19,46%, $p<0,01$), ZP (-20,69%, $p=0,01$) e ZH (-13,46%, $p<0,01$) em comparação ao grupo Sham. Já nos fêmures seguidos por dezesseis semanas (Figura 50B), o grupo TV 5Hz e TV 50Hz exibiram valores inferiores de AT (-27,85%, $p=0,04$ e -21,81%, $p<0,01$, respectivamente) e de ZH (-37,64%, $p<0,01$ e -29,44%, $p=0,01$, respectivamente) em comparação ao grupo Sham.

Figura 50 – Gráficos com valores das medidas da área total (AT), da área da zona proliferativa (ZP) e da área da zona hipertrófica (ZH) da cartilagem de crescimento dos fêmures dos grupos seguidos por quatro (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores de AT ($p<0,01$), ZP ($p=0,01$) e ZH ($p<0,01$) em comparação ao grupo Sham. B: O grupo 5Hz exibiu menores valores em AT ($p=0,04$) e ZH ($p<0,01$) e 50Hz apresentaram valores inferiores de AT e ZH ambos comparados ao grupo Sham ($p\leq 0,01$).

Nas tíbias seguidas por quatro semanas (Figura 51), o grupo TV 50Hz apresentou valores inferiores de AT (-22,90%, $p=0,03$) e ZH (-35,54%, $p<0,01$) que o grupo Sham. O grupo TV 5Hz exibiu valores inferiores de AT (+24,08%, $p=0,01$) e ZH (+42,97%, $p=0,02$) que o grupo TV 50Hz. Nos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 51B), TV 50Hz exibiu valores inferiores de AT (-22,89%, $p=0,02$) e ZP (-18,16%, $p<0,01$) que o grupo Sham. Além disso, o grupo TV 5Hz apresentou valores inferiores de AT (-27,55%, $p=0,01$) que o grupo Sham.

Figura 51 – Gráficos com valores das medidas da área total (AT), da área da zona proliferativa (ZP) e da área da zona hipertrófica (ZH) da cartilagem de crescimento das tíbias dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: o grupo TV 50Hz exibiu valores inferiores de AT ($p=0,03$) e ZH ($p<0,01$) que o grupo Sham. O grupo TV 5Hz apresentou valores superiores de AT ($p=0,01$) e ZH ($p=0,02$) que o grupo TV 50Hz. B: o grupo TV 50Hz apresentaram valores inferiores de AT ($p=0,02$) e ZP ($p<0,01$) que o grupo Sham. O grupo TV 5Hz também exibiu valores inferiores de AT ($p=0,01$) em comparação ao grupo Sham.

5.3.6.3. Análise da contagem das células hipertróficas e calcificadas

As figuras 52 e 53 apresentam os resultados das análises quantitativas das células hipertróficas (CH) e calcificadas (CC) dos fêmures e tíbias, respectivamente.

Nos fêmures seguidos por quatro semanas (Figura 52A) foi possível observar menor quantidade de células hipertróficas no grupo TV 50Hz (-19,82%, $p=0,01$) que no grupo Sham. Já nos fêmures seguidos por dezesseis semanas (Figura 52B) não foi possível observar diferenças significativas.

Figura 52 – Gráficos expressam a quantidade de células hipertróficas (CH) e calcificadas (CC) da cartilagem de crescimento de fêmures dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: O grupo TV 50Hz apresentou menor quantidade de CH que o grupo Sham ($p=0,01$). B: Não houve diferença entre os grupos.

Nas tíbias seguidas por 4 semanas (Figura 53A) foi possível observar menor quantidade de células hipertróficas nos grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) que no grupo Sham (-23,57%, $p=0,03$ e -24,22%, $p<0,01$, respectivamente). Já nas tíbias seguidas por 16 semanas (Figura 53B) foi possível observar maior quantidade de células hipertróficas nos grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) que no grupo Sham (+57,46%, $p=0,01$ e +33,43%, $p<0,01$, respectivamente).

Figura 53 – Gráficos expressam a quantidade de células hipertróficas (CH) e calcificadas (CC) da cartilagem de crescimento de tíbias dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Os grupos submetidos à vibração (5 e 50Hz) exibiram menores quantidades de CH ($p=0,03$ e $p<0,01$, respectivamente) que no grupo Sham. B: Os grupos submetidos à vibração exibiram maiores quantidades de CH ($p=0,01$ e $p<0,01$) comparado ao grupo Sham ($p<0,01$).

5.3.6. Análise mecânica

As figuras 54, 55 e 56 apresentam os resultados dos testes mecânicos de flexão de três pontos nos fêmures, cisalhamento da cartilagem de crescimento nas tíbias e de compressão nas vértebras L5, com obtenção dos parâmetros força máxima (em N) e rigidez (em N/mm).

Não foi observada diferença significativa na análise mecânica dos fêmures no período de quatro semanas (Figura 54A). Entretanto, o grupo TV 50Hz apresentou maiores valores de força máxima e rigidez que os grupos Sham (+5,76%, $p=0,12$ e +8,64%, $p=0,37$, respectivamente) e TV 5Hz (+4,07%, $p=0,39$ e +16,28%, $p=0,22$, respectivamente). Com relação aos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 54B), a terapia por vibração (tanto de 5 como de 50Hz) resultou em aumentos na força máxima (+128,28% e +138,77%, $p<0,0001$) e na rigidez (+183,50% e +192,59%, $p<0,0001$) em comparação ao grupo Sham.

Figura 54– Gráficos expressam os valores da força máxima e da rigidez relativa dos fêmures submetidos ao teste mecânico de flexão de três pontos dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, entretanto TV 50Hz exibiu valores superiores que Sham e TV 5Hz tanto na força máxima como na rigidez. B: TV 5Hz e TV 50Hz apresentaram valores superiores de força máxima e rigidez relativa comparados ao grupo Sham ($p<0,0001$).

Não foi observada diferença significativa na análise mecânica das tíbias, tanto no período de quatro semanas (Figura 55A), como no seguimento por dezesseis semanas (Figura 55B).

Figura 55 – Gráficos expressam os valores da força máxima e da rigidez das tíbias submetidas ao teste mecânico de cisalhamento dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). Não houve diferença significativa entre os grupos examinados.

Não foi observada diferença significativa na análise mecânica das vértebras no período de quatro semanas (Figura 56A). Com relação aos grupos seguidos por dezesseis semanas (Figura 56B), a terapia por vibração (tanto de 5 como de 50Hz) resultou em maior rigidez (+57,58%, $p < 0,01$ e +72,40%, $p < 0,01$) que o grupo Sham. Além disso, o grupo TV 50Hz apresentou aumento não significativo na força máxima em comparação aos grupos TV 5Hz (+12,64%, $p = 0,44$) e Sham (+37,52% $p = 0,06$).

Figura 56 – Gráficos expressam os valores da força máxima e da rigidez nas vértebras submetidas ao teste mecânico de compressão dos grupos seguidos por 4 (A) e 16 semanas (B). A: Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. B: Os grupos TV 5Hz e TV 50Hz exibiram maiores valores de rigidez que o grupo Sham ($p<0,01$).

Discussão

6. DISCUSSÃO

A terapia por vibração tem sido utilizada como coadjuvante em diversos tratamentos e treinamentos desportivos em decorrência de inúmeros efeitos positivos, associados à baixa documentação de efeitos colaterais. A plataforma vibratória tem sido incluída tanto em estudos clínicos como em experimentais, e em ambos têm apresentado resultados positivos no tecido ósseo e muscular (12, 15). Além da atuação como recurso terapêutico para manutenção e ganho de massa óssea, a terapia por vibração também exerce papel importante no aumento da potência muscular e propriocepção, bem como no controle da dor e em disfunções neurológicas (12, 15, 16, 21, 49-51). Apesar da publicação de resultados positivos na literatura, há relatos de efeitos negativos e inconclusivos decorrentes da vibração no tecido ósseo e cartilaginoso de animais em fase de maturação esquelética, assim como ao longo da idade adulta (22, 23, 42, 49, 52-57)

É durante o período da infância e adolescência que ocorre o estirão de crescimento e com ele o maior ganho em comprimento longitudinal dos ossos, concomitante com importante ganho de massa óssea, ou seja, aquisição de minerais importantes para o crescimento, formação e manutenção óssea saudável ao longo da vida. Embora tudo isso se dê durante a fase púbere, sabe-se que o pico de massa óssea acontece entre a segunda e terceira década de vida (58-60) e é decisivo para a qualidade óssea posterior.

Atualmente, o uso excessivo de dispositivos eletrônicos está diretamente relacionado à diminuição da atividade física, exposição de brincadeiras ao ar livre e à inatividade precoce em crianças e adolescentes. Como resultado, há menor sobrecarga mecânica atuando no tecido musculoesquelético, bem como déficit de absorção da vitamina D decorrente da menor exposição à luz solar, resultando em menor ganho de massa óssea (61, 62). Sabe-se que o tecido ósseo é sensível a mudanças metabólicas, hormonais e nutricionais. Sendo assim, alterações intrínsecas e extrínsecas ao organismo podem interferir na aquisição de massa óssea máxima, acelerar o processo de perda óssea natural ou afetar o equilíbrio da remodelação óssea, levando a doenças osteometabólicas e ao aumento do risco de fraturas patológicas no futuro (61). Segundo a lei de Wolff, quanto maior a tensão exercida sobre o osso, maior será sua densidade mineral. Desta forma, esforços mecânicos ou atividades físicas regulares induzem efeitos positivos no tecido ósseo (33, 54, 63) por meio da conversão de estímulos mecânicos (gravitacional e de contração muscular) em eventos bioquímicos denominados de mecanotransdução (32, 33, 63, 64).

Além dos divergentes resultados da terapia por vibração no tecido musculoesquelético em fase de maturação, há grande divergência com relação ao protocolo de vibração, dificultando comparações entre diferentes estudos e limitando conclusões quanto aos efeitos da terapia neste tecido. Os protocolos variam desde os parâmetros mecânicos da vibração; frequência e deslocamento vertical da plataforma vibratória (53, 65), bem como, na dosagem de exposição à terapia; frequência semanal e tempo de cada sessão.

Diante das limitações apresentadas, este estudo foi conduzido com o objetivo de identificar os efeitos da terapia por vibração nos tecidos ósseos e cartilagosos de ratos saudáveis em fase de maturação esquelética, além da comparação de diferentes protocolos mecânicos de vibração. Optou-se por comparar as frequências vibratórias por ser o fator mais variável na literatura (53, 65). A frequência de 5Hz foi selecionada devido à maior proteção articular como observado no recente estudo conduzido por Junbo e colaboradores. A frequência de 50Hz foi selecionada devido aos conhecidos e positivos resultados descritos na literatura com relação a aumento na qualidade óssea (21, 65), associado à escassez de estudos direcionados à cartilagem de crescimento. Além disso, objetivamos identificar se os resultados decorrentes da vibração persistiriam após interrupção da terapia no tecido musculoesquelético maduro. Sendo assim, dois diferentes períodos de análise foram estabelecidos de acordo com a maturação esquelética dos animais.

Neste estudo foi constatado efeito negativo da terapia por vibração com frequência de 5Hz tanto no tecido ósseo como no cartilaginoso. Com relação ao tecido ósseo, foi detectada redução na densidade e conteúdo mineral ósseo nos fêmures, tíbias e vértebras dos animais submetidos a quatro semanas de terapia por vibração. Além disso, os resultados densitométricos negativos persistiram nos fêmures e tíbias dos animais mesmo após interrupção terapêutica. As alterações negativas também foram confirmadas em nível microscópico, com redução nos parâmetros microestruturais de formação óssea e aumento nos parâmetros microestruturas de reabsorção óssea nos fêmures, tíbias e vértebras em ambos os períodos de seguimento, sobretudo nos de quatro semanas, em que foi constatado aumento na atividade reabsortiva dos animais submetidos à frequência vibratória de 5Hz. Corroborando os achados densitométricos e estruturais, a terapia por vibração com frequência de 5Hz também resultou em efeitos negativos com relação à resistência mecânica. As vértebras dos grupos submetidos à vibração apresentaram menores valores de força máxima, enquanto as tíbias e fêmures exibiram menor rigidez. Com relação à placa de crescimento, foi possível observar que a terapia por vibração de 5Hz resultou em redução nas células cartilagosas da

zona hipertrófica, na área e na espessura total da cartilagem mesmo após a interrupção do tratamento, em animais acompanhados por período de dezesseis semanas.

Acredita-se que o efeito negativo da vibração de 5Hz se deu por meio de alterações negativas na cartilagem de crescimento, que reduziram a atividade e diferenciação celular com consequente supressão na formação óssea e aumento na atividade osteoclástica na região metafisária. Além da supressão na atividade óssea em decorrência das alterações na cartilagem de crescimento, acreditamos que a formação óssea por aposição também tenha sido comprometida uma vez que nossas análises macroscópicas evidenciaram reduções perimétricas diafisárias e metafisárias. Embora os efeitos da terapia por vibração sejam mais comumente estudados em ossos submetidos à descarga de peso como fêmures e tíbias, as vértebras foram incluídas neste estudo e foi possível observar que a terapia por vibração de 5Hz também se mostrou deletéria aos tecidos ósseos submetidos à sobrecarga gravitacional parcial. Além das vértebras, os ossos parietais do crânio também foram investigados neste estudo, com o objetivo de identificar algum efeito sistêmico não dependente de sobrecarga mecânica, seja ela gravitacional ou muscular. No entanto, nossos resultados não detectaram qualquer alteração nesses ossos. Dessa forma, entendemos que a plataforma vibratória atua nos tecidos ósseos por meio da mecanotransdução.

Em estudo recente, Junbo e colaboradores compararam diferentes frequências de vibração, dentre elas 5Hz, e detectaram que as frequências mais baixas promoveram efeito protetivo ao tecido cartilaginoso articular em ratos adultos (65). Desta forma, hipotetizamos que efeito protetivo semelhante também aconteceria na cartilagem de crescimento. No entanto, nossos resultados convergem para a conclusão de que a frequência de 5Hz acarreta alterações negativas na placa de crescimento, bem como no tecido ósseo metafisário e cortical de animais saudáveis em fase de maturação esquelética, que persistiram na fase adulta mesmo após a interrupção da terapia.

Em oposição aos resultados obtidos com a frequência de 5Hz, foi possível observar que a terapia por vibração de 50Hz apresentou efeitos benéficos tanto para o tecido ósseo como para a cartilagem de crescimento em animais em crescimento, que persistiram na fase adulta. Com relação ao tecido ósseo, foi constatado aumento na densidade e conteúdo mineral ósseo nos fêmures, tíbias e vértebras dos animais submetidos a quatro semanas de terapia por vibração, que persistiram mesmo após interrupção terapêutica. As alterações positivas também foram confirmadas em nível microscópico, com aumento nos parâmetros microestruturais de formação óssea e redução nos parâmetros microestruturais de reabsorção

óssea nos fêmures, tíbias e vértebras em ambos os períodos de seguimento, sobretudo nos de quatro semanas. Corroborando os achados densitométricos e estruturais, a terapia por vibração com frequência de 50Hz também resultou em aumento macroscópico nas medidas de perimetria diafisária, além de maior resistência mecânica à fratura. Nossos resultados mecânicos de compressão nas vértebras maduras evidenciaram aumento na força máxima e rigidez. Corroborando nossos achados, Cai e colaboradores detectaram efeitos osteogênicos positivos da terapia por vibração com frequência de 45Hz, associada à exposição eletromagnética, em animais adultos e idosos saudáveis (66). Com relação ao tecido cartilaginoso na placa de crescimento, foi possível detectar maior organização nas colunas celulares e possivelmente maior atividade e diferenciação celular. Detectamos redução na espessura e áreas das zonas proliferativa e hipertrófica das cartilagens de crescimento, que podem estar relacionadas e de forma proporcional ao aumento na zona de ossificação e maior formação óssea decorrente de maior atividade e diferenciação celular.

A maioria dos estudos na literatura faz uso de animais adultos, com mais de oito semanas de idade e consequente inatividade da cartilagem de crescimento. No entanto, há autores que investigaram os efeitos da terapia por vibração em animais em crescimento (53-56). Minematsu e colaboradores utilizaram terapia por vibração com diferentes frequências (15, 30, 45, 60 e 90Hz) em animais em fase de maturação esquelética (um mês de idade) e não detectaram alterações significativas no comprimento dos ossos das tíbias. No entanto, os autores observaram respostas ósseas positivas quando utilizaram frequências mais altas (45Hz e 60Hz) (53), corroborando nossos achados com relação aos animais tratados com frequência de 50Hz. Xie e colaboradores observaram que a vibração com frequência de 45Hz durante três semanas foi eficaz em estimular atividade osteoblástica e suprimir atividade osteoclástica em camundongos em crescimento. Os autores não detectaram diferenças significativas com relação às medidas morfométricas nas cartilagens de crescimento desses animais (56). Em outro estudo também com animais em crescimento (sete semanas), foi observado que frequências mais elevadas (90Hz) atuam na qualidade do tecido cortical, como mostrado por Gnyubkin e colaboradores (55). Em nosso estudo detectamos diferença positiva com relação ao tecido cortical nos animais submetidos à vibração com frequência de 50Hz.

A literatura também apresenta diversos estudos envolvendo a ação da plataforma vibratória em animais com distúrbios osteometabólicos. No entanto, os animais utilizados nesses estudos são adultos com cartilagem de crescimento inativa. Estudos prévios não apresentaram resultados osteogênicos positivos decorrentes do uso da vibração com

frequência de 25Hz em ratos machos com lesão medular (67). Ma e colaboradores observaram aumento na massa óssea e nos parâmetros microestruturais de formação óssea, concomitante a redução nos parâmetros de reabsorção após aplicação única de vibração com frequência de 35Hz em animais ovariectomizados (68). Falcai e colaboradores, por outro lado, detectaram aumento na resistência óssea em animais adultos com osteoporose por desuso (método de suspensão pela cauda) devido tratamento com plataforma vibratória de 50Hz (21), corroborando nossos achados positivos com relação a esta frequência em animais saudáveis em crescimento. Frequências semelhantes também foram previamente utilizadas pelo nosso grupo em animais com perda de massa óssea por diferentes mecanismos e em todos os experimentos os resultados foram positivos, tanto no tecido ósseo intacto como no osso em processo de consolidação óssea após fratura diafisária (17, 18, 34). O primeiro experimento utilizou a lesão medular para induzir o quadro osteoporótico e a terapia por vibração na frequência de 60Hz como forma de intervenção terapêutica. Os resultados obtidos demonstraram aumento na massa óssea e resistência mecânica em fêmures, tíbias e vértebras, além de induzir aumento no número de trabéculas ósseas, redução do espaçamento entre elas e aumento nos níveis séricos de osteocalcina e osteoprotegerina (34). No segundo experimento, também com frequência de 60Hz, a terapia por vibração foi eficaz em promover aumento na massa óssea e nos parâmetros microestruturais de formação óssea trabecular em animais ovariectomizados e submetidos à fratura óssea na região diafisária do fêmur (18). No terceiro experimento a frequência de 50Hz de vibração foi aplicada em ratas diabéticas que foram submetidas à fratura óssea na região diafisária do fêmur. O tratamento aumentou o perímetro na metáfise distal dos fêmures, a densidade, a área e volume do calo ósseo, bem como os parâmetros microtomográficos de formação óssea nos animais diabéticos submetidos à vibração (17).

Diante dos resultados conflitantes e inconclusivos presentes na literatura, este estudo foi conduzido com o propósito de elucidar os efeitos de diferentes frequências de vibração em ossos e cartilagens de crescimento de animais saudáveis em fase de maturação esquelética. Hipotetizamos que a frequência de 5Hz seria benéfica para o tecido musculoesquelético protegendo a cartilagem de danos mecânicos (52, 65). Experiências prévias com animais adultos nos conduziram à segunda proposta deste estudo em elucidar se a frequência de 50Hz, conhecida por seus efeitos osteogênicos positivos no tecido ósseo maduro (17, 21), também seria benéfica quando aplicada em tecido ósseo em fase de maturação esquelética. Nossos resultados não comprovaram nossa primeira hipótese, em que evidenciamos efeito negativo

tanto na cartilagem de crescimento como no tecido ósseo em animais em fase de crescimento submetidos à terapia por vibração com frequência de 5Hz. Por outro lado, a frequência de 50Hz mostrou-se benéfica tanto para a cartilagem de crescimento como para o tecido ósseo de ratos saudáveis e em crescimento.

O modelo animal de ratos Wistar Hannover tem sido amplamente utilizado em pesquisas devido à alta correspondência entre fisiologia, anatomia e comportamento de ratos e humanos. Além disso, os ratos são de fácil manuseio, apresentam padrão de crescimento bem conhecido e homogêneo. Optou-se pelo uso de animais machos, visto que possuem menores níveis do hormônio estrogênio atuando sobre a densidade óssea do que animais fêmeas, ou seja, permitindo maior controle da diferença individual com relação às características ósseas (53).

Este estudo foi eficaz em elucidar algumas dúvidas e incertezas com relação aos efeitos de diferentes frequências de vibração na cartilagem de crescimento e no tecido ósseo de animais em crescimento. A vibração com frequência de 50Hz resultou em aumento na atividade celular, estimulando a diferenciação no disco epifisário com consequente efeito osteogênico em nível trabecular e cortical. Também foi evidenciado que os efeitos positivos deste protocolo de vibração persistiram no tecido ósseo maduro mesmo com a interrupção da terapia. No entanto, investigações futuras são necessárias para elucidar se os resultados condro e osteogênicos obtidos no presente estudo persistirão em animais jovens com distúrbios osteometabólicos como osteogênese imperfeita, raquitismo, osteopetrose e osteoporose secundária a doenças neurológicas.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Com relação aos diferentes protocolos de vibração utilizados neste estudo, concluímos que a frequência de 5Hz, inicialmente hipotetizada como protetiva à cartilagem de crescimento, apresentou resultados negativos tanto para a cartilagem como para o tecido ósseo de ratos em fase de crescimento. A frequência de 50Hz foi eficaz em promover resultados positivos tanto na cartilagem de crescimento como no tecido ósseo, estimulando a formação óssea com consequente aumento no volume, massa e resistência mecânica.

Conclui-se também que o efeito da terapia por vibração aplicada durante a maturação esquelética em ratos saudáveis persistiu na fase adulta mesmo após interrupção do tratamento. Desta forma, tanto os resultados negativos da frequência de 5Hz, como os positivos da frequência de 50Hz foram observados nos ossos maduros dos animais em fase adulta.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Cartilaginoso. In: Koogan G, editor. *Histologia Básica*. 12º ed. Rio de Janeiro - RJ2013. p. 125-30.
2. Lui JC, Jee YH, Garrison P, Iben JR, Yue S, Ad M, et al. Differential aging of growth plate cartilage underlies differences in bone length and thus helps determine skeletal proportions. *PLoS biology*. 2018 Jul;16(7):e2005263. PubMed PMID: 30036371. Pubmed Central PMCID: 6056026.
3. Chau M, Lui JC, Landman EB, Spath SS, Vortkamp A, Baron J, et al. Gene expression profiling reveals similarities between the spatial architectures of postnatal articular and growth plate cartilage. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e103061. PubMed PMID: 25068449. Pubmed Central PMCID: 4113381.
4. Hall HBK, Miyake MT. The membranous skeleton: the role of cells condensations in vertebrae skeletogenesis. *Anatomy and Embryology*. 1992 24 march;186:107-24. English.
5. Shefelbine SJ, Carter DR. Mechanobiological predictions of growth front morphology in developmental hip dysplasia. *J Orthop Res*. 2004 march 2004;22:346-52. English.
6. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015 Nov;80:14-8. PubMed PMID: 26453494. Pubmed Central PMCID: 4602167.
7. Schenk R. Basic Histomorphology and Physiology of Skeletal Growth. *Treatment of Fractures in Children and Adolescents*. 1. New York: Springer, Berlin, Heidelberg; 1980. p. 3-19.
8. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Ósseo. In: Koogan G, editor. *Histologia Básica*. 12º ed. Rio de Janeiro - RJ2013. p. 131-48.
9. Shefelbine SJ, Tardieu C, Carter DR. Development of the Femoral Bicondylar Angle in Hominid Bipedalism. *Bone*. 2002 May 30;765-70. English.
10. Bosco C, Colli R, Introini E, Cardinale M, Tsarpela O, Madella A, et al. Adaptive responses of human skeletal muscle to vibration exposure. *Clinical Physiology*. 1999 13 november 19(2):183-7. English.
11. Li H, Wu W, He X, Cao C, Yu X, Zeng Y, et al. Applying vibration in early postmenopausal osteoporosis promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and suppresses postmenopausal osteoporosis progression. *Biosci Rep*. 2019;39(9). English.
12. Annino G, Iellamo F, Palazzo F, Fusco A, Lombardo M, Campoli F, et al. Acute changes in neuromuscular activity in vertical jump and flexibility after exposure to whole body vibration. *Medicine*. 2017 Aug;96(33):e7629. PubMed PMID: 28816944. Pubmed Central PMCID: 5571681.
13. Slatkovska L, Alibhai SMH, Beyene J, Hu H, Demaras A, Cheung AM. Effect of 12 months of Whole-Body Vibration Therapy on Bone Density and Structure in Postmenopausal Women. *Annals of Internal Medicine*. 2011 15 november 155(10):669-79. English.
14. Issurin VB, Liebermann DG, Tenenbaum G. Effect of vibratory stimulation training on maximal force and flexibility. *Journal os Sports Sciences*. 1994 30 march 12(6):561-6. English.
15. El-Shamy S. Effect of whole body vibration training on quadriceps strength, bone mineral density and fuctional capacity in children with hemophilia: a randomized clinical trial. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2017 27 april 17(2):19-26. English.
16. Alev A, Mihriban A, Bilge E, Ayca E, Merve K, Seyma C, et al. Effects of whole body vibration therapy in pain, function and depression of the patients with fibromyalgia. *Complementary therapies in clinical practice*. 2017 Aug;28:200-3. PubMed PMID: 28779930.
17. Campos MS. Consolidação óssea após fratura diafisária do fêmur em ratas diabéticas tratadas com terapia por vibração [Dissertation]. Ribeirão Preto-SP: Universidade de São Paulo; 2016.
18. Butezloff MM, Zamarioli A, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Volpon JB. Whole-body vibration improves fracture healing and bone quality in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Acta Cir Bras*. 2015;30(11):727-35. English.
19. Xie L, Rubin C, Judex S. Enhancement of the adolescent murine musculoskeletal system using low-level mechanical vibration. *J Appl Physiology*. 2008 5 april;104:1056-62. English.

20. Komrakova M, Hoffmann DB, Nuehnen V, Stueber H, Wassmann M, Wicke M, et al. The Effect of Vibration Treatments Combined with Teriparatide or Strontium Ranelate on Bone Healing and Muscle in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int.* 2016;99(4):408-22. English.
21. Falcai MJ, Zamarioli A, Okubo R, de Paula FJ, Volpon JB. The osteogenic effects of swimming, jumping, and vibration on the protection of bone quality from disuse bone loss. *Scandinavian journal of medicine & science in sports.* 2015 Jun;25(3):390-7. PubMed PMID: 24779886.
22. McCann MR, Yeung C, Pest MA, Ratneswaran A, Pollmann SI, Holdsworth DW, et al. Whole-body vibration of mice induces articular cartilage degeneration with minimal changes in subchondral bone. *Osteoarthritis and cartilage.* 2017 May;25(5):770-8. PubMed PMID: 27840128.
23. McCann MR, Veras MA, Yeung C, Lalli G, Patel P, Leitch KM, et al. Whole-body vibration of mice induces progressive degeneration of intervertebral discs associated with increased expression of Il-1beta and multiple matrix degrading enzymes. *Osteoarthritis and cartilage.* 2017 May;25(5):779-89. PubMed PMID: 28104539.
24. Gomes LS, Volpon JB. Estudo experimental do processo de reparação das lesões epifisárias tipo III e IV de Salter e Harris. *Revista Brasileira de Ortopedia.* 1991 maio;26:161-6. Português.
25. Macsai CE, Hopwood B, Chung R, Foster BK, Xian CJ. Structural and molecular analyses of bone bridge formation within the growth plate injury site and cartilage degeneration at the adjacent uninjured area. *Bone.* 2011 Oct;49(4):904-12. PubMed PMID: 21807132.
26. Sabharwal S, Sabharwal S. Growth Plate Injuries of the Lower Extremity: Case Examples and Lessons Learned. *Indian Journal Orthopaedics* 2018. p. 462-9.
27. Pando R, Even-Zohar N, Shtaiif B, Edry L, Shomron N, Phillip M, et al. MicroRNAs in the growth plate are responsive to nutritional cues: association between miR-140 and SIRT1. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2012 Nov;23(11):1474-81. PubMed PMID: 22402365.
28. Nishimura R, Hata K, Takahata Y, Murakami T, Nakamura E, Yagi H. Regulation of Cartilage Development and Diseases by Transcription Factors. *Journal of bone metabolism.* 2017 Aug;24(3):147-53. PubMed PMID: 28955690. Pubmed Central PMCID: 5613019.
29. D.M. S, S.J. M-S, G. N, M.O. W. Integrin-Interleukin-4 Mechanotransduction Pathways in Human Chondrocytes. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2001 October 2001(391S):S49-S60. English.
30. Judas F, Palma P, Falacho R, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo.: Faculdade de Medicina de Coimbra; 2012.
31. Horton JA, Bariteau JT, Loomis RM, Strauss JA, Damron TA. Ontogeny of skeletal maturation in the juvenile rat. *Anatomical record.* 2008 Mar;291(3):283-92. PubMed PMID: 18228587.
32. Gusmão CVB, Belangero WD. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico. *Revista Brasileira de Ortopedia.* 2009;44(4):299-305. Português.
33. Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the Functional Response of Bone to Mechanical Strain. *Calcif Tissue Int.* 1995;57:344-58.
34. Zamarioli A. Estudo da estrutura óssea de ratos após lesão medular: análise da intervenção de técnicas fisioterapêuticas [Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2012.
35. Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2004 Mar;19(3):343-51. PubMed PMID: 15040821.
36. Gilsanz V, Wren TA, Sanchez M, Dorey F, Judex S, Rubin C. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2006 Sep;21(9):1464-74. PubMed PMID: 16939405.
37. Leung KS, Shi HF, Cheung WH, Qin L, Ng WK, Tam KF, et al. Low-magnitude high-frequency vibration accelerates callus formation, mineralization, and fracture healing in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2009 Apr;27(4):458-65. PubMed PMID: 18924140.

38. Shi HF, Cheung WH, Qin L, Leung AH, Leung KS. Low-magnitude high-frequency vibration treatment augments fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic bone. *Bone*. 2010 May;46(5):1299-305. PubMed PMID: 19961960.
39. Hagbarth KE, Eklund G. Tonic vibration reflexes (TVR) in spasticity. *Brain Research*. 1966;2:201-3.
40. Issurin VB, Tenenbaum G. Acute and residual effects of vibratory stimulation on explosive strength in elite and amateur athletes. *Journal of Sports Sciences*. 1999;17:177-82.
41. Bressel E, Gibbons MW, Samaha A. Effect of whole body vibration on stereotypy of young children with autism. *BMJ case reports*. 2011 Apr 19;2011. PubMed PMID: 22696626. Pubmed Central PMCID: 3082064.
42. McCann MR, Patel P, Pest MA, Ratneswaran A, Lalli G, Beaucage KL, et al. Repeated exposure to high-frequency low-amplitude vibration induces degeneration of murine intervertebral discs and knee joints. *Arthritis & rheumatology*. 2015 May;67(8):2164-75. PubMed PMID: 25891852.
43. Falcai MJ. Desenvolvimento de um sistema modificado de suspensão do rato pela cauda, como modelo de osteopenia [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2011.
44. Knox M, Fluckey JD, Bennett P, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE. Hindlimb Unloading in Adult Rats Using an Alternative Tail Harness Design. *Aviation, Space and Environmental Medicine*. 2004;75(8).
45. Andersen ML, Tufik S. Animal models as tools in ethical biomedical research: Unifesp; 2010.
46. Santiago HA, De Pierro LR, Reis RM, Caluz AG, Ribeiro VB, Volpon JB. Allometric relationships among body mass, MUZZLE-tail length, and tibia length during the growth of Wistar rats. *Acta Cir Bras*. 2015 Nov;30(11):743-8. PubMed PMID: 26647793.
47. Burghardt AJ, Link TM, Majumdar S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Aug;469(8):2179-93. PubMed PMID: 21344275. Pubmed Central PMCID: 3126972.
48. Fontoura Filho C. Efeito da deficiência protéico-calórica sobre a resistência mecânica de ossos de ratas. Estudo do cisalhamento sobre a placa de crescimento proximal da tíbia e da flexão sobre a diáfise femoral. [Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2000.
49. Qin J, Chow SK, Guo A, Wong WN, Leung KS, Cheung WH. Low magnitude high frequency vibration accelerated cartilage degeneration but improved epiphyseal bone formation in anterior cruciate ligament transect induced osteoarthritis rat model. *Osteoarthritis and cartilage*. 2014 Jul;22(7):1061-7. PubMed PMID: 24852700.
50. Gusso S, Munns CF, Colle P, Derraik JGB, Biggs JB, Cutfield WS, et al. Effects of whole-body vibration training on physical function, bone and muscle mass in adolescents and young adults with cerebral palsy. *Nature*. 2016 03 mar 6:7.
51. Ward K, Alsop C, Caulton J, Rubin C, Adams J, Mughal Z. Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004 Mar;19(3):360-9. PubMed PMID: 15040823.
52. Kerr GJ, McCann MR, Branch JK, Ratneswaran A, Pest MA, Holdsworth DW, et al. C57BL/6 mice are resistant to joint degeneration induced by whole-body vibration. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017 Mar;25(3):421-5. PubMed PMID: 27720885.
53. Minematsu A, Nishii Y, Imagita H, Sakata S. Possible effects of whole body vibration on bone properties in growing rats. *Osteoporosis and sarcopenia*. 2019 Sep;5(3):78-83. PubMed PMID: 31728424. Pubmed Central PMCID: 6838745.
54. Zhang T, Gao J, Fang J, Gong H. Multiscale investigation on the effects of additional weight bearing in combination with low-magnitude high-frequency vibration on bone quality of growing female rats. *J Bone Miner Metab*. 2018 Mar;36(2):157-69. PubMed PMID: 28293780.
55. Gnyubkin V, Guignandon A, Laroche N, Vanden-Bossche A, Malaval L, Vico L. High-acceleration whole body vibration stimulates cortical bone accrual and increases bone mineral content in growing mice. *Journal of biomechanics*. 2016 Jun 14;49(9):1899-908. PubMed PMID: 27178020.

56. Xie L, Jacobson JM, Choi ES, Busa B, Donahue LR, Miller LM, et al. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone*. 2006 Nov;39(5):1059-66. PubMed PMID: 16824816.
57. Gómez-Cabello AG-A, Alejandro; Morales, Silvia; Ara, Ignacio; Casajús, José A; Vicente-Rodrigue, Germán. Effects of a short-term whole body vibration intervention on bone mass and structure in elderly people. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2014;17(2):160-4.
58. Boot AM, de Ridder MA, van der Sluis IM, van Slobbe I, Krenning EP, Keizer-Schrama SM. Peak bone mineral density, lean body mass and fractures. *Bone*. 2010 Feb;46(2):336-41. PubMed PMID: 19833245.
59. Ausili E, Rigante D, Salvaggio E, Focarelli B, Rendeli C, Ansuini V, et al. Determinants of bone mineral density, bone mineral content, and body composition in a cohort of healthy children: influence of sex, age, puberty, and physical activity. *Rheumatology international*. 2012 Sep;32(9):2737-43. PubMed PMID: 21809005.
60. Krahenbühl T, Gonçalves EM, Costa ET, Barros Filho AA. Factors that influence bone mass of healthy children and adolescents measured by quantitative ultrasound at the hand phalanges: a systematic review. *Revista Paulista de Pediatria*. 2014;32(3):266–72.
61. Mora S, Gilsanz V. Establishment of peak bone mass. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2003;32(1):39-63.
62. Saggese G, Vierucci F, Prodam F, Cardinale F, Cetin I, Chiappini E, et al. Vitamin D in pediatric age: consensus of the Italian Pediatric Society and the Italian Society of Preventive and Social Pediatrics, jointly with the Italian Federation of Pediatricians. *Italian journal of pediatrics*. 2018 May 8;44(1):51. PubMed PMID: 29739471. Pubmed Central PMCID: 5941617.
63. Sasso GRS, Ricardo Santos Simões RS, Florencio-Silva R. Estímulo mecânico e formação óssea – Como o exercício físico estimula a formação do osso? *Atualidades médicas*. 2018 01 Fev;1:20-4.
64. Rosa N, Simoes R, Magalhaes FD, Marques AT. From mechanical stimulus to bone formation: A review. *Medical engineering & physics*. 2015 Aug;37(8):719-28. PubMed PMID: 26117332.
65. Junbo W, Sijia L, Hongying C, Lei L, Pu W. Effect of low-magnitude different-frequency whole-body vibration on subchondral trabecular bone microarchitecture, cartilage degradation, bone/cartilage turnover, and joint pain in rabbits with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2017;18:260:1-11.
66. Cai J, Shao X, Yan Z, Liu X, Yang Y, Luo E, et al. Differential skeletal response in adult and aged rats to independent and combinatorial stimulation with pulsed electromagnetic fields and mechanical vibration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2020 Feb;34(2):3037-50. PubMed PMID: 31908035.
67. Minematsu A, Nishii Y, Imagita H, Takeshita D, Sakata S. Whole-body vibration can attenuate the deterioration of bone mass and trabecular bone microstructure in rats with spinal cord injury. *Spinal cord*. 2016 Aug;54(8):597-603. PubMed PMID: 26690857.
68. Ma R, Zhu D, Gong H, Gu G, Huang X, Gao J, et al. High-frequency and low-magnitude whole body vibration with rest days is more effective in improving skeletal micro-morphology and biomechanical properties in ovariectomised rodents. *Hip international : the journal of clinical and experimental research on hip pathology and therapy*. 2012 Mar-Apr;22(2):218-26. PubMed PMID: 22344486.

Anexo

ANEXO I

Anexo cópia da aprovação do comitê de ética e pesquisa.

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<h2 style="margin: 0;">DECLARAÇÃO</h2>		
<p>Declaramos que o Adendo ao Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número 085/2018 sobre o projeto intitulado "<i>Efeitos da terapia por vibração no tecido ósseo e cartilaginoso de ratos: influência dos parâmetros vibracionais em diferentes fases de maturação esquelética</i>", sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Batista Volpon, está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 29 de outubro de 2018.</p>		
<p>We declare that the Addendum to the Protocol n° 085/2018, entitled "<i>Effects of vibration therapy on bony and cartilaginous tissue in rats: influence of vibrational parameters in different phases of skeletal maturation</i>", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/29/2018.</p>		
<p>Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2018</p> <div style="text-align: center;"> Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho Coordenador da CEUA – FMRP – USP </div>		
<p style="font-size: small; margin: 0;">Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP – Av. Bandeirantes, 3900 – Ribeirão Preto – SP – Brasil – 14049-900 – Tel: (16) 3361-1337 / 3361-3215 – e-mail: ceua@fmrp.usp.br</p>		

Manuscrito

High-Frequency Vibration Stimulates Growth Plate and Bone Formation in Growing Rats

1.Mariano, Suelen Albertini¹, 2.Volpon, Jose Batista¹, 3.Ximenez, Joao Paulo², 4.Silva, Raquel³, 5.Issa, Joao Paulo³, 6.Pitol, Dimitrius³, 7.Shimano, Antônio Carlos¹, 8.Zamarioli, Ariane^{1*}

1 School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

2 School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

3 School of Dentistry of Ribeirão Preto of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

***Corresponding author: Ariane Zamarioli**

Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900

Telephone: +55 16 33153272, Fax: +55 16 33153272

E-mail: ariane_zamarioli@hotmail.com

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Financial support: The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial funding in developing this study.

Conflict of interest: None for all authors.

Abstract

Vibration therapy (VT) has been used as a coadjutant in several treatments and physical training. However, the effects on growth plate and the different frequencies are yet to be elucidated. Here, we aimed to compare different VT frequencies on bone and growth plate in growing rats and to analyze the effects after training interruption. 72 rats were assigned into three groups: (1) Sham; (2) 5HzVT and; (3) 50HzVT, subsequently divided into two subgroups; 4 weeks of VT (4w) and 4-week-VT plus 12-week-follow-up (16w). Positive effects on bone and growth plate were evidenced in response to 50HzVT: higher bone mass and formation-related microtomographic parameters, concomitant to lower resorption-related parameters in femurs, tibias, and vertebrae. We detected an improvement in growth plate anatomy and function, leading to increased collagen deposition at the metaphyseal bone, associated with lower resorption activity, thus resulting in bone formation stimulation and higher strength. The beneficial effects of this vibration protocol persisted throughout bone maturation, even after the training interruption. On the other hand, the 5HzVT exhibited negative effects on bone and growth plate, persisting after treatment interruption. Our findings suggest beneficial effects of the 50Hz VT, which persisted in long-term-follow-up after training interruption.

Keywords: Vibration; frequency; growth plate; bone tissue; skeletal maturation.

Introduction

During maturation, both the longitudinal bone growth and the significant gain in bone mass occur and are of great importance for minerals acquisition for bone health, formation, and maintenance throughout life¹⁻³. Some pediatric metabolic bone diseases significantly alter bone biomechanical properties resulting in increased fracture risk⁴. Osteopetrosis is a rare inherited bone disease characterized by increased bone density due to resorption inhibition, thus leading to brittle bone⁵. Rickets is another pediatric bone disease where bones are undermineralized, usually secondary to vitamin D deficiency⁶. Osteogenesis imperfecta is an inherited disorder in which abnormal collagen is produced⁷. Aside from these osteometabolic disruptions, conditions of inactivity may also lead to lower bone mass peak, thus resulting in mature bone with lower mass and quality^{8,9}. Whole-body vibration (WBV) training is widely used to improve physical fitness and bone mass^{10,11}. Vibration therapy has been shown to represent a potent non-pharmacological approach in treating bone loss. In fact, WBV was reported to prevent bone loss and the rate of falls. However, the effects of WBV on bone health remain controversial, in which the scientific literature exhibit studies reporting both positive¹²⁻¹⁵ and negative effects¹⁶, while others report no effect¹⁷⁻²⁰. The controversy among reports in literature may be attributed to the divergent parameters and protocols used during vibration. As of note, the frequency of the vibrating platform varies from 3 to 90Hz among the experimental studies^{21,22}. In studies using growing animals, those exposed to the highest frequencies (45 and 60Hz) showed the most positive osteogenic effects²¹. Additionally, the effects of WBV in children are inconclusive and may be deleterious to the growth plate²³⁻²⁷. Previous reports have documented the protective effects of lower frequencies for the cartilaginous tissue ²². Although the authors used adult rats with osteoarthritis as their animal model, we hypothesized that 5Hz vibration frequency may protect the growth plate and still play an important osteogenic effect on bone tissue. Furthermore, we aimed to compare its effects to those from the 50Hz frequency.

Methods

Animals and study design

All procedures and resources used in this study were previously approved by the Animal Experimentation Ethics Committee from our Institution. Seventy-two five-week Wistar Hannover rats were used in this study and allowed acclimatization one week prior to the experimentation. Throughout the experimental period, they were kept without restriction of

access to water and food, at a room temperature of 20 to 24°C, with light control (light/dark: alternation of 12 hours) and relative humidity control of 45 to 55%.

The animals were divided into two main groups (4 and 16 weeks), and each group was divided into three subgroups according to the follow-up time (n=12 per group): (1) Sham-4w; (2) 5HzVT-4w; (3) 50HzVT-4w; (4) Sham-16w; (5) 5HzVT-16w; and (6) 50HzVT-16w. In the 4w groups (n=36), the animals were euthanized at nine weeks of age, representing a phase of longitudinal bone growth and simulating children/adolescents. In the 16w groups (n=36), the animals were euthanized at 21 weeks of age, representing a skeletal maturation phase, thus simulating adults.

Vibration therapy

The animals were submitted to vibration therapy at a frequency of either five or 50Hz, with a vertical displacement of 1 mm²⁸. The vibrating platform consists of an acrylic compartment with an upper opening and two acrylic walls to allow a simultaneous training of four animals in individual compartments. All procedures were performed at the same time of the day for 20 minutes, five days per week, in the same laboratory and by specialized personnel.

Bone growth and sample collection

In vivo weekly measures were performed at the tibia in order to control the animal's growth throughout the study.

Immediately at the end of the experimental period and following the guidelines of the American Veterinary Medicine Association, the animals were euthanized, and the tibias, femurs, lumbar vertebrae (L4 and L5), and parietal bones (calvaria) were collected, dissected, and cleaned of soft tissues for bone densitometry, computerized microtomographic analysis, histomorphometry, and mechanical evaluation. Tibial growth plates were also analyzed by histomorphometry and mechanical tests.

Bone densitometry

Bones were submitted to densitometric analysis by DXA assessment (Dual-energy X-ray absorptiometry). Specific densitometric measurements were performed per bone: distal metaphysis and diaphysis at the femurs; proximal metaphysis and diaphysis at the tibias. The region of interest (ROI) was 0.08 cm², and the BMD (bone mineral density) and BMC (bone mineral content) values were calculated based on the region of interest. The coefficient of variance was 4.5%.

Bone microarchitecture

After densitometry, microstructural trabecular and cortical bones were assessed by computerized microtomographic analysis (GE Phoenix S240, German). Through the DXR250RT 1000x1000 pixels detector, the following parameters were selected during the examination: 60Kv, 150 μ A, 1000 projections with an average of four exposures of 333ms, ensuring a resolution of 16 μ m. After three-dimensional reconstruction, the morphometric analysis was conducted using the CTAn software, where trabecular and cortical bones were isolated and separately assessed (Bruker-microCT, version 2.2.1).

For the tibial and femoral trabecular analysis, the proximal and distal metaphysis of the tibia and femur, respectively, were analyzed for an extension of 3mm starting immediately at the end of the growth plate. In the vertebrae, the total trabecular content encompassed by both growth plates was selected for analysis. For the parietal bones, a 0.3x0.66mm ROI was drawn by a 1.44mm extension on the right side of each sample. The following trabecular parameters were calculated: total volume (TV, mm³); bone volume (BV, mm³); bone volume fraction (BV/TV,%); specific bone surface (BS/BV, 1/mm); structure index model (SMI); trabeculae thickness (Tb.Th, mm); trabecular number (Tb.N, 1/mm); trabecular separation (Tb.Sp, mm) and connectivity density (Conn.D, 1/mm³).

For the tibial and femoral cortical analysis, the diaphyses were analyzed for an extension of 2 mm starting 8 mm from the proximal growth plate at the tibia and the distal growth plate at the femur. The following cortical parameters were calculated: cortical volume (Ct.V, mm³) and cortical thickness (Ct.Th, mm).

Bone and growth plate mechanical strength

The left femurs were used for the three-point-bending assay by a universal testing machine, with a 500N load cell and a 1 mm/min vertical displacement speed. The load was applied to the anterior region of the femoral diaphysis.

The L4 vertebral bodies were used for the mechanical compression tests. Prior to the assay, the posterior vertebral elements were removed, and a discectomy was conducted. A pre-load accommodation time of 30 seconds was selected and the vertical displacement was conducted at a speed of 0.5 mm/min.

The left tibiae were subjected to a mechanical shear test at the proximal growth plate as previously published²⁹. In brief, the bones were sectioned in the distal metaphysis of the tibia in order to obtain 26mm long samples. The distal end of this fragment was included in a

cylindrical resin block (polymethylmethacrylate), leaving a 7mm segment exposed to the mechanical test, conducted at a speed of 10mm/min.

The mechanical parameters analyzed were maximum load (N) and stiffness (N/mm).

Growth plate and bone histomorphometry

For histomorphometric analysis of the growth plate, the tibial sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), analyzed under light microscopy (Axiovert, Carl Zeiss, Germany), and the images were captured with a CCD camera (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Germany) with 50x magnification. Three photographs were taken for each section, and quantitative analysis was performed using the ImageJ software (NIH, version 1.52a). The following parameters were measured: (1) total growth plate area (TA, in μm^2); (2) proliferative zone area, (PA, in μm^2) and; (3) hypertrophic zone area (HA, in μm^2).

Adjacent sections were stained with picosirius red to allow collagen assessment (type 1 and total collagen) at the femurs, tibias, and vertebrae. The images were acquired in polarized light microscopy with 400-fold magnification (AxioImager® Z2 microscope, Zeiss, Germany) and CCD digital camera (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Germany). The Axiovision® program was used to calculate the collagen deposition area expressed in μm^2 .

TRAP staining was used to calculate osteoclastic activity, with a magnification of $\times 100$. The TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)-positive area was measured as a percentage of the entire bone area (%).

Statistics

The normality of the dependent variables was tested using the Shapiro-Wilk test. The comparison of groups for each follow-up period (four and sixteen weeks) was performed using One-Way ANOVA, followed by Tukey's posthoc test, considered a method that controls type 1 error in multiple comparisons. All statistical analyses were performed with SPSS (version 2.0), and p values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

There was no significant difference regarding the animals' body mass at the beginning of the experiment ($p>0.05$). The gain in body mass during the study was time-dependent and occurred in a similar way between groups. In the animals followed for sixteen weeks, the Sham group exhibited lower body mass than the vibrated groups, but without significant difference.

Corroborating the homogeneity of body mass at the study entry, there was also no statistical difference in the tibial length among the groups ($p>0.05$, Figure 1). In the four-week-follow-up groups, the tibias grew 32% in the Shams, 24% in the 5HzVT, and 26 in the 50HzVT group ($p<0.01$) from the study entry. It is possible to observe that from the second week onwards, the tibial growth of animals not subjected to vibration becomes greater than that of animals subjected to vibration, but without significant difference ($p>0.05$).

For groups followed for a period of sixteen weeks, the tibias of the animals grew by 52.37% ($p<0.01$), 47.32% ($p<0.01$), and 49.96% ($p<0.01$) for Sham, 5HzVT, and 50HzVT, respectively, between the beginning and the end of the experiment ($p>0.05$). It was possible to observe that in the interval between the fourth and sixth weeks, the tibial growth of animals submitted to vibration with a frequency of 5Hz was lower than the growth in the other groups, but without significant difference ($p>0.05$). This result is suggestive of the negative effect of the 5Hz vibration frequency on the growth plate, which resulted in less bone growth during the four-week treatment, persisting with a peak in the subsequent two weeks. After this period, bone growth normalized in this group, compatible with the other groups.

Higher bone densitometry in response to 50 Hz vibration therapy

Fifty Hz vibration therapy induced higher BMD and BMC at the distal femoral metaphysis in comparison with the 5HzVT group after four weeks of training, which persisted in the 16-week-follow-up groups ($p<0.01$). Conversely, reductions in BMD and BMC were seen at the distal femoral metaphysis of the 5HzVT-4w group in comparison with the Shams, which also persisted after vibration interruption ($p<0.01$, Table 1).

Similar findings were detected at the tibias, in which 50HzVT induced higher BMD and BMC at the tibial diaphysis in comparison with 5HzVT and Sham ($p<0.01$) groups after four weeks of training. Likewise, 50HzVT also induced increases at the BMD and BMC at the proximal tibial metaphysis in comparison with the the 5HzVT group after four weeks of training. Conversely, reductions in BMD and BMC were seen at the tibial diaphysis of 5HzVT-4w group in comparison with Sham, which also persisted after vibration interruption.

Additionally, the 5HzVT also evidenced lower BMD and BMC at the tibial proximal diaphysis compared to the Sham after four weeks of training (Table 1).

50 Hz vibration therapy improves bone microarchitecture and strength

Figure 2 and Table 1 show the effects of 50 Hz vibration therapy on improving both trabecular and cortical bone at the femurs and tibias, which persisted after training interruption. As of note, four weeks of 50Hz vibration therapy significantly increased bone volume fraction (BV/TV) by 19% ($p=0.01$), trabecular number (Tb.N) by 16% ($p=0.02$), and cortical volume by 14% ($p=0.03$) in comparison with the 5HzVT group. Osteogenic effects of 50Hz vibration therapy also persisted after training interruption, with a 28% increase in bone volume (BV, $p=0.04$), 26% in BV/TV ($p=0.01$), and 10% in cortical volume ($p=0.01$) when compared to 5Hz vibration therapy. Furthermore, 5Hz vibration resulted in a reduction in cortical volume when compared to the Shams, -9% ($p=0.01$) after four weeks vibrating and -7% ($p<0.01$) after training interruption.

Similar osteogenic effects were also detected at the tibias (Table 1), in which 50Hz vibration therapy induced increases in formation-related microstructural parameters (49% in BV, 54% in BV/TV, and 48% in Tb.N, $p<0.01$) and reductions in resorption-related parameters (36% in SMI and 21% in Tb.Sp, $p<0.01$) following four weeks of training, in comparison with the 5Hz vibration frequency. Conversely, lower vibration frequency for four weeks resulted in a 13% decrease in cortical volume when compared to the shams ($p=0.03$). Chronically, the positive effects of 50 Hz vibration also persisted after training interruption when compared to 5Hz frequency (+6% in Ct.BV, $p<0.04$). Likewise, the negative effects of lower frequency also persisted after training interruption, with an 8% reduction in cortical volume ($p=0.01$) in comparison with sham rats.

Remarkably, the osteogenic effects of 50Hz vibration therapy also occurred in partial weight-bearing bones (e.g., lumbar vertebra, Table 1), in which a 22% increase was noted at Conn.D in comparison with the 5HzVT group ($p<0.01$) after four weeks of vibration. Conversely, the 5HzVT group led to a 15% decrease in BV/TV ($p=0.01$) when compared to the Sham. Likewise, these effects were also detected in non-weight bearing bones (e.g., calvaria), with a non-significant increase in BV/TV by 13% and Tb.Th by 10% in rats submitted to a 4-week-50Hz vibration therapy versus lower frequency, which persisted after vibration interruption resulting in a significant 20% increase in Tb.N ($p<0.01$).

As a result of these microstructural changes in bone tissue, vibration therapy led to increased bone strength in mature rats, detected by higher maximal load and stiffness in vibrated bones

than in the shams at the femurs ($p<0.0001$, Table 1). Similar findings were also detected at the vertebrae with significant increases in stiffness due to vibration ($p<0.01$).

Increased collagen deposition and reduced resorptive area due to 50Hz vibration therapy

Our histomorphometric findings evidence a twofold increase in type 1 collagen (the most abundant collagen in the bone) at the femurs in response to 50Hz vibration therapy in comparison with the Sham and 5HzVT groups ($p<0.02$) following four weeks of training. After training interruption, type 1 collagen deposition persisted higher in both vibration frequency groups compared to the Shams at the femurs and tibiae ($p<0.04$, Figure 3A). At the vertebrae, a similar trend was noted, but no significant difference was detected. Total collagen deposition was also measured (Figure 3B), and higher levels were detected at the femurs due to a 4-week 50Hz training ($p>0.05$). After training interruption, both vibration protocols exhibited higher total collagen deposition at the femurs and vertebrae ($p<0.04$, Figure 3B). Figure 4 evidences a 123% increase in the resorptive area due to a lower frequency of vibration therapy when compared to the Sham rats ($p=0.04$) after four weeks of training at the femurs. Conversely, four weeks of 50Hz vibration therapy resulted in decreased resorption area, which persisted in mature rats with a 45% decrease in comparison with lower frequency ($p=0.02$). The concomitant increase in collagen deposition and decreased bone resorption in response to 50Hz vibration therapy resulted in thicker trabeculae at the metaphyseal bone in femurs and tibiae (Figure 4B).

Higher chondrogenic activity in response to 50Hz vibration therapy

We detected reductions in the tibial growth plate total area (TA), proliferative zone area (PA) and hypertrophic zone area (HA) at the femurs and tibiae in vibrated animals in comparison to the Shams (Figure 5A). Furthermore, we noted a reduction in the resting zone concomitant with the inhibition of early apoptosis due to four weeks of 50Hz vibration therapy in comparison with the lower frequency (Figure 5B). Although no mechanical changes were detected at the growth plate (Figure 5C), our histomorphometrical changes may infer a compensatory increase in the ossification zone explaining the higher bone formation adjacent to the growth plate.

Discussion

Vibration therapy has been used as an adjunct in several therapeutical treatments and sports training due to numerous positive effects, concomitant with very few side effects. The vibrating platform has been included in both clinical and experimental studies, and both have shown positive results in bone and muscle tissue 10,30. In addition to acting as a therapeutic resource for maintaining and gaining bone mass, vibration therapy also plays an important role in increasing muscle power and proprioception, as well as in controlling pain and neurological disorders 10,30-32 33,34. Despite the positive outcomes, there are reports of negative and inconclusive effects due to the vibration therapy on the bone and cartilage tissue in growing animals, as well as throughout adulthood 16,21,34-41. Additionally, there is a wide divergence in relation to the vibration protocol, making comparisons between different studies difficult. In this study, we chose to compare the vibration frequency as it may be considered the most inconstant parameter in the literature 21,22. The frequency of 5Hz was selected due to joint protection, as observed in a recent study 22. Therefore, we hypothesized that a similar protective effect would also occur on the growth plate. The 50Hz frequency was selected due to the documented osteogenic effects of vibration therapy in increasing bone quality and quantity 22,32, associated with a gap in literature approaching these outcomes on the growth plate. In addition, we aimed to assess whether the vibration effects would persist after the training interruption in mature skeletal tissue. Thus, two different end-point analyses were established according to the animals' skeletal maturation.

In this study, we report a negative effect of 5 Hz vibration therapy on the growth plate, as well as on the trabecular and cortical bone in healthy growing rats, which persisted in adulthood even after the training cessation. With regards to the bone tissue, we found a reduction in bone mineral density and content at the femurs and tibias in rats submitted to four-week-vibration therapy. Furthermore, these negative densitometric outcomes persisted after training interruption. Negative changes were also detected in microscopic levels, with a reduction in the formation-related microstructural parameters, concomitant with an increase in the resorption-related parameters at the femurs, tibias, and vertebrae in both end-point analyses, especially in the four-week-follow-up, in which an increase in the resorptive area was found in animals trained by 5Hz vibration therapy. We believe the negative effect of the 5Hz vibration therapy was due to a decrease in cell activity and differentiation with consequent suppression in metaphyseal bone formation. Although the effects of vibration therapy are most commonly studied in weight-bearing bones such as femurs and tibias, the vertebrae were included in this study and also exhibited negative changes due to the 5Hz frequency protocol.

Parietal bones were also investigated in this study, with the aim of identifying any systemic effects not dependent on mechanical load. Our results did not detect any changes in these bones, leading us to the conclusion that the vibrating platform plays a role in the bone tissue by means of mechanotransduction.

Differently than the 5Hz vibration outcomes, the 50Hz protocol induced chondro and osteogenic effects in growing animals, which persisted throughout skeletal maturation. We detected an increase in bone density and mineral content at the femurs and tibias in animals submitted to four weeks of vibration therapy, whose changes persisted after training. Microscopically, the 50Hz vibration therapy led to an increase in the formation-related microstructural parameters, concomitant with a reduction in the resorption parameters at the femurs, tibias, and vertebrae in both end-point analyses, especially in the four-week-follow-up. Corroborating the densitometric and microstructural findings, the 50Hz vibration therapy trended towards a higher mechanical strength against fracture. With regards to the growth plate, we detected a better cell organization, concomitant with reductions in total area, proliferative and hypertrophic zones in response to 50Hz vibration therapy. We attribute these changes to a counteract proportional increase in the ossification zone and higher bone formation due to greater cellular activity and differentiation.

This study was effective in elucidating some uncertainties regarding the effects of different vibration frequencies on the growth plate and bone tissue in growing rats. Higher frequency increased cell activity, stimulating differentiation at the epiphyseal plate with consequent osteogenic effect at the trabecular and cortical bone. It has also been demonstrated maintenance of these positive changes at the skeletally mature bone after training interruption. Further investigations are necessary to elucidate whether the chondro and osteogenic results obtained in this study will persist in young animals with osteometabolic disorders such as osteogenesis imperfecta, rickets, osteopetrosis, and osteoporosis secondary to neurological diseases.

In conclusion, the initial hypothesis of the chondroprotective effect of 5Hz vibration therapy was not confirmed and revealed negative macro and microstructural changes not only to the growth plate but also to the trabecular and cortical bones in growing rats. On the other hand, the 50Hz frequency protocol confirmed the important role as an osteogenic approach to induce bone formation and also induced positive changes at the growth plate. We also concluded that the effect of vibration therapy applied during skeletal maturation in healthy rats persisted in adulthood even after its interruption.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel. (CAPES) and by the Laboratory of Bioengineering, which provided resources and facilities to conduct the experiments.

Reference

- 1 Boot, A. M. et al. Peak bone mineral density, lean body mass and fractures. *Bone* 46, 336-341, doi:10.1016/j.bone.2009.10.003 (2010).
- 2 Ausili, E. et al. Determinants of bone mineral density, bone mineral content, and body composition in a cohort of healthy children: influence of sex, age, puberty, and physical activity. *Rheumatology international* 32, 2737-2743, doi:10.1007/s00296-011-2059-8 (2012).
- 3 Krahenbühl, T., Gonçalves, E. M., Costa, E. T. & Barros Filho, A. A. Factors that influence bone mass of healthy children and adolescents measured by quantitative ultrasound at the hand phalanges: a systematic review. *Revista Paulista de Pediatria* 32, 266–272, doi:10.1590/1984-0462201432319 (2014).
- 4 Forestier-Zhang, L. & Bishop, N. Bone strength in children: understanding basic bone biomechanics. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition* 101, 2-7, doi:10.1136/archdischild-2015-308597 (2016).
- 5 Stark, Z. & Savarirayan, R. Osteopetrosis. *Orphanet journal of rare diseases* 4, 5, doi:10.1186/1750-1172-4-5 (2009).
- 6 Elder, C. J. & Bishop, N. J. Rickets. *The Lancet* 383, 1665-1676, doi:10.1016/s0140-6736(13)61650-5 (2014).
- 7 Imbert, L., Auregan, J. C., Pernelle, K. & Hoc, T. Mechanical and mineral properties of osteogenesis imperfecta human bones at the tissue level. *Bone* 65, 18-24, doi:10.1016/j.bone.2014.04.030 (2014).
- 8 Mora, S. & Gilsanz, V. Establishment of peak bone mass. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 32, 39-63, doi:10.1016/s0889-8529(02)00058-0 (2003).
- 9 Saggese, G. et al. Vitamin D in pediatric age: consensus of the Italian Pediatric Society and the Italian Society of Preventive and Social Pediatrics, jointly with the Italian Federation of Pediatricians. *Italian journal of pediatrics* 44, 51, doi:10.1186/s13052-018-0488-7 (2018).
- 10 Annino, G. et al. Acute changes in neuromuscular activity in vertical jump and flexibility after exposure to whole body vibration. *Medicine* 96, e7629, doi:10.1097/MD.00000000000007629 (2017).
- 11 El-Shamy, S. Effect of whole body vibration training on quadriceps strength, bone mineral density and functional capacity in children with hemophilia: a randomized clinical trial. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 17, 19-26 (2017).
- 12 C.L., L. et al. Effect of 6 months of whole body vibration on lumbar spine bone density in postmenopausal women: a randomized controlled trial *Clinical Interventions in Aging*, 1603 - 1609, doi:10.2147/CIA.S53591 (2013).
- 13 B.R., B. & T. L., N. The Effect of 8 Mos of Twice-Weekly Low- or Higher Intensity Whole Body Vibration on Risk Factors for Postmenopausal Hip Fracture. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 89, 997 - 1009 (2010).

- 14 B. Humphries, A. Fenning, E. Dugan, J. Guinane & MacRae, K. Whole-body vibration effects on bone mineral density in women with or without resistance training. *Aviat Space Environ Med* 80(12), doi:10.3357/ase.2573.2009. (2009).
- 15 Verschuere, S. M. et al. Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19, 352-359, doi:10.1359/JBMR.0301245 (2004).
- 16 Zhang, T., Gao, J., Fang, J. & Gong, H. Multiscale investigation on the effects of additional weight bearing in combination with low-magnitude high-frequency vibration on bone quality of growing female rats. *J Bone Miner Metab* 36, 157-169, doi:10.1007/s00774-017-0827-6 (2018).
- 17 Kiel, D. P. et al. Low-Magnitude Mechanical Stimulation to Improve Bone Density in Persons of Advanced Age: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 30, 1319-1328, doi:10.1002/jbmr.2448 (2015).
- 18 Liphardt, A. M., Schipilow, J., Hanley, D. A. & Boyd, S. K. Bone quality in osteopenic postmenopausal women is not improved after 12 months of whole-body vibration training. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 26, 911-920, doi:10.1007/s00198-014-2995-8 (2015).
- 19 A. Gómez-Cabello et al. Effects of a short-term whole body vibration intervention on bone mass and structure in elderly people. *Journal of Science and Medicine in Sport* 17, 160-164, doi:https://doi.org/10.1016/j.jsams.2013.04.020 (2014).
- 20 W. O. Runge et al. Bone changes after short-term whole body vibration are confined to cancellous bone. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 18, 485-492 (2018).
- 21 Minematsu, A., Nishii, Y., Imagita, H. & Sakata, S. Possible effects of whole body vibration on bone properties in growing rats. *Osteoporosis and sarcopenia* 5, 78-83, doi:10.1016/j.afos.2019.07.001 (2019).
- 22 Junbo, W., Sijia, L., Hongying, C., Lei, L. & Pu, W. Effect of low-magnitude different-frequency whole-body vibration on subchondral trabecular bone microarchitecture, cartilage degradation, bone/cartilage turnover, and joint pain in rabbits with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 18:260, 1-11, doi:10.1186/s12891-017-1579-0 (2017).
- 23 Hogler, W. et al. The Effect of Whole Body Vibration Training on Bone and Muscle Function in Children With Osteogenesis Imperfecta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 102, 2734-2743, doi:10.1210/jc.2017-00275 (2017).
- 24 C. Stark, P. Nikopoulou-Smyrni, A. Stabrey, O. Semler & Schoenau, E. Effect of a new physiotherapy concept on bone mineral density, muscle force and gross motor function in children

with bilateral cerebral palsy. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 10, 151-158 (2010).

25 Bressel, E., Gibbons, M. W. & Samaha, A. Effect of whole body vibration on stereotypy of young children with autism. *BMJ case reports* 2011, doi:10.1136/bcr.02.2011.3834 (2011).

26 Matute-Llorente, A., Gonzalez-Aguero, A., Gomez-Cabello, A., Vicente-Rodriguez, G. & Casajus Mallen, J. A. Effect of whole-body vibration therapy on health-related physical fitness in children and adolescents with disabilities: a systematic review. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine* 54, 385-396, doi:10.1016/j.jadohealth.2013.11.001 (2014).

27 Gomez-Bruton, A. et al. Effects of Whole Body Vibration on Tibia Strength and Structure of Competitive Adolescent Swimmers: A Randomized Controlled Trial. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* 10, 889-897, doi:10.1016/j.pmrj.2018.03.015 (2018).

28 Zamarioli, A. Estudo da estrutura óssea de ratos após lesão medular: análise da intervenção de técnicas fisioterapêuticas [Doutorado], Universidade de São Paulo, (2012).

29 Guedes, P. et al. Undernutrition impairs the quality of growth plate and trabecular and cortical bones in growing rats¹. *Acta Cir Bras* 34, e201900301, doi:10.1590/s0102-865020190030000001 (2019).

30 El-Shamy, S. Effect of whole body vibration training on quadriceps strength, bone mineral density, and functional capacity in children with hemophilia: a randomized clinical trial. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 17, 19-26 (2017).

31 Alev, A. et al. Effects of whole body vibration therapy in pain, function and depression of the patients with fibromyalgia. *Complementary therapies in clinical practice* 28, 200-203, doi:10.1016/j.ctcp.2017.06.008 (2017).

32 Falcai, M. J., Zamarioli, A., Okubo, R., de Paula, F. J. & Volpon, J. B. The osteogenic effects of swimming, jumping, and vibration on the protection of bone quality from disuse bone loss. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 25, 390-397, doi:10.1111/sms.12240 (2015).

33 Qin, J. et al. Low magnitude high frequency vibration accelerated cartilage degeneration but improved epiphyseal bone formation in anterior cruciate ligament transect induced osteoarthritis rat model. *Osteoarthritis and cartilage* 22, 1061-1067, doi:10.1016/j.joca.2014.05.004 (2014).

34 Ward, K. et al. Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19, 360-369, doi:10.1359/JBMR.040129 (2004).

35 McCann, M. R. et al. Whole-body vibration of mice induces progressive degeneration of intervertebral discs associated with increased expression of Il-1beta and multiple matrix degrading enzymes. *Osteoarthritis and cartilage* 25, 779-789, doi:10.1016/j.joca.2017.01.004 (2017).

- 36 McCann, M. R. et al. Whole-body vibration of mice induces articular cartilage degeneration with minimal changes in subchondral bone. *Osteoarthritis and cartilage* 25, 770-778, doi:10.1016/j.joca.2016.11.001 (2017).
- 37 McCann, M. R. et al. Repeated exposure to high-frequency low-amplitude vibration induces degeneration of murine intervertebral discs and knee joints. *Arthritis & rheumatology* 67, 2164-2175, doi:10.1002/art.39154 (2015).
- 38 Kerr, G. J. et al. C57BL/6 mice are resistant to joint degeneration induced by whole-body vibration. *Osteoarthritis and cartilage* 25, 421-425, doi:10.1016/j.joca.2016.09.020 (2017).
- 39 Gusso, S. et al. Effects of whole-body vibration training on physical function, bone and muscle mass in adolescents and young adults with cerebral palsy. *Nature* 6, 7, doi:10.1038 (2016).
- 40 Gnyubkin, V. et al. High-acceleration whole body vibration stimulates cortical bone accrual and increases bone mineral content in growing mice. *Journal of biomechanics* 49, 1899-1908, doi:10.1016/j.jbiomech.2016.04.031 (2016).
- 41 Xie, L. et al. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone* 39, 1059-1066, doi:10.1016/j.bone.2006.05.012 (2006).

Table and Figure Legends

Table 1. Bone densitometry, microstructural morphometry assessed by μ CT, and mechanical strength of femurs, tibias, vertebrae and parietal bones. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. TV: tissue volume, BV: bone volume; BV/TV: bone volume fraction; BS/BV: specific bone surface; SMI: structure model index; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: trabecular number; Tb.Sp: trabecular separation; Conn.D: connectivity density; Ct.V: cortical volume; Ct.Th: cortical thickness. Sample sizes for all bones are n=6. Statistical comparisons were performed within same follow-up period, designated by ^a when $p < 0.05$ versus Sham, and by ^b when $p < 0.05$ versus 5Hz vibration therapy group. Bolded text highlight significant differences.

Figure 1. Weekly tibial growth throughout the study. A: In the 4w-follow-up groups, we may observe that from the second week onwards, the non-vibrated rats exhibited greater bone growth than the vibrated animals, but without significant difference. B: ($p > 0.05$). A: In the 16w-follow-up groups, the tibial growth in the 5HzVT group was lower than the other groups in the interval between the fourth and the sixth week (in response to VT training, $p > 0.05$). Bone growth was normalized after the sixth week (in response to VT cessation).

Figure 2. Representative microtomographic images of the femurs (A) and tibias (B) in the groups: Sham, 5HzVT, and 50HzVT, followed by 4 and 16 weeks.

Figure 3. Picosirius-stained slides were used to quantify type 1 collagen (A) and total collagen (B) in femurs, tibias, and vertebrae in the groups: Sham, 5HzVT, and 50HzVT followed by 4 and 16 weeks. A: The histomorphometric analysis evidenced higher type 1 collagen deposition in the femurs of the 50HzVT-4w group versus Sham and 5HzVT ($p < 0.02$). In the 16w-follow-up groups, both vibrating protocols led to higher type 1 in femurs and tibias compared to the Sham ($p < 0.04$). B: The 50HzVT-4w group trended towards higher total collagen deposition at the femurs in comparison with the other groups ($p > 0.05$). Both vibration protocols exhibited higher total collagen deposition at the femurs and vertebrae ($p < 0.04$).

Figure 4 – A: TRAP-stained slides were used to quantify the bone resorptive area in femurs, tibias, and vertebrae in the groups: Sham, 5HzVT, and 50HzVT followed by 4 and 16 weeks. The histomorphometric analysis evidenced a 123% higher resorptive area in the 5HzVT group when compared to the Sham rats ($p = 0.04$) after four weeks of training at the femurs. In the

16w-follow-up groups, the 50HzVT resulted in a lower resorption area versus 5HzVT group ($p=0.02$). B: Histological sections stained with HE show a marked increase of trabecular bone at the metaphyseal bone in femurs and tibias in response to 50Hz vibration therapy. Magnification of 100X.

Figure 5. A: Growth plate histomorphometry detected lower total area (TA), proliferative zone area (PA), and hyperthorific zone area (HA) at the femurs and tibias in vibrated animals in comparison to the Shams. B: HE-stained slides show a reduction in the resting zone concomitant with the inhibition of early apoptosis and improvement in the growth cartilage cells vertical organization due to 4w-50Hz vibration therapy in comparison with the lower frequency. Magnification of 100X. C: No changes were detected by means of mechanical test at the tibial growth plate.

Table 1.

		4 weeks follow-up			16 weeks follow-up		
		Sham	5Hz	50Hz	Sham	5Hz	50Hz
Bone Densitometry	Femur	Diaphyseal BMD (g/cm ³)	0.14±0.015	0.14±0.011	0.15±0.017	0.23±0.026	0.24±0.029
		Diaphyseal BMC (g)	0.01±0.001	0.02±0.002	0.01±0.002	0.02±0.002	0.02±0.002
		Metaphyseal BMD (g/cm ³)	0.13±0.018	0.10±0.008*	0.13±0.020^b	0.18±0.019	0.16±0.017*
		Metaphyseal BMC (g)	0.01±0.001	0.01±0.001*	0.01±0.002^b	0.01±0.002	0.01±0.001*
	Tibia	Diaphyseal BMD (g/cm ³)	0.13±0.012	0.115±0.008*	0.16±0.018^{ab}	0.21±0.019	0.19±0.014*
		Diaphyseal BMC (g)	0.01±0.001	0.009±0.008	0.01±0.002^{ab}	0.02±0.002	0.01±0.001*
		Metaphyseal BMD (g/cm ³)	0.11±0.009	0.085±0.011*	0.14±0.023^b	0.16±0.020	0.16±0.021
		Metaphyseal BMC (g)	0.01±0.001	0.007±0.001*	0.01±0.002^b	0.01±0.002	0.01±0.002
μCT	Trabecular Femur	TV (mm ³)	24.5±2.8	23.9±3.1	24.7±3.2	28.6±2.3	36.6±24.1
		BV (mm ³)	2.5±1.7	2.4±0.8	4.03±0.9	5.8±1.2	4.7±1.1
		BV/TV (%)	10.2±6.3	10.2±2.8	16.6±3.9^b	20.08±3.0	17.0±3.0
		BS/BV (1/mm)	80.3±35.6	64.0±10.3	53.6±7.7	38.9±1.8	42.6±3.7
		SMI	2.0±0.5	2.01±0.5	1.6±0.1	1.5±0.2	1.6±0.2
		Tb.Th (mm)	0.05±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.1±0.004	0.1±0.01
		Tb.N (1/mm)	1.8±0.8	1.8±0.5	2.5±0.4^b	2.2±0.3	2.04±0.4
		Conn.D (1/mm ²)	159.6±65.0	102.7±33.5	138.7±22.7	97.4±19.2	97.02±29.1
	Cortical Femur	Ct.BV (mm ³)	9.2±0.7	8.7±0.4*	9.25±1.0^b	14.7±0.7	13.4±0.3*
		Ct.Th (mm)	0.4±0.12	0.3±0.1	0.5±0.2	0.7±0.1	0.7±0.1
	Trabecular Tibia	TV (mm ³)	30.2±4.0	30.04±4.2	30.8±4.6	32.1±4.3	30.4±4
		BV (mm ³)	4.2±2.5	3.8±3.1	5.6±0.8^b	5.3±2.1	4.8±1.4
		BV/TV (%)	13.7±8.0	8.7±3.3	18.5±3.2^b	16.2±5	15.8±4.8
		BS/BV (1/mm)	82.0±37.2	85.2±26.0	63±8.1	45.6±2.8	47.1±3.6
		SMI	1.7±0.5	2.1±0.6	1.4±0.1^b	1.8±0.2	1.8±0.2
		Tb.Th (mm)	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.005	0.08±0.004	0.1±0.005
		Tb.N (1/mm)	2.6±1.2	2.0±0.7	3.4±0.3^b	2.1±0.6	2.2±0.3
		Tb.Sp (mm)	0.2±0.05	0.3±0.06	0.2±0.01^b	0.4±0.1	0.3±0.05
		Conn.D (1/mm ²)	173.8±49.1	149.7±68.3	209.9±57.05	89.7±40.8	89.2±33.3
μCT	Cortical Tibia	Ct.BV (mm ³)	8.1±0.2	7.06±1.0*	8.1±1.04	12.3±0.8	11.04±0.24*
		Ct.Th (mm)	0.3±0.06	0.2±0.1	0.3±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1
	Vertebra	TV (mm ³)	9.7±2.6	10.0±1.8	9.8±2.6	17.3±2.1	14.3±2.8
		BV (mm ³)	2.4±0.7	2.1±0.3	2.2±0.8	5.3±1.03	4.4±1.1
		BV/TV (%)	24.5±2.8	20.7±0.8*	22.4±3.3	30.4±2.5	31.02±5.3
		BS/BV (1/mm)	44.4±3.2	47.7±2.0	48.5±4.1	37.5±1.3	37.2±4.6
		SMI	1.1±0.2	1.2±0.06	1.2±0.1	0.6±0.2	0.7±0.2
		Tb.Th (mm)	0.07±0.005	0.07±0.003	0.1±0.01	0.1±0.004	0.1±0.01
		Tb.N (1/mm)	3.239 ±0.31	2.9±0.1	3.2±0.3	3.6±0.3	3.6±0.3
		Tb.Sp (mm)	0.2±0.01	0.3±0.01	0.2±0.02	0.2±0.02	0.2±0.02
		Conn.D (1/mm ²)	128.1 ± 23.1	119.1±10.0	145.1±11.2^b	113.1±19.5	112.2±23.05
	Parietal	BV (mm ³)	0.2±0.01	0.2±0.03	0.1±0.02	0.2±0.03	0.2±0.02
		BV/TV (%)	60.3±6.6	62.2±11.4	68.1±8.9	93.3±11.3	93.01±1.4
		BS/BV (1/mm)	25.8±4.6	25.0±5.4	22.3±1.2	14.6±4.4	14.4±3.6
		SMI	1.2±0.2	1.3±0.2	0.7±1.02	0.8±0.4	0.8±0.3
		Tb.Th (mm)	0.1±0.02	0.2±0.03	0.2±0.01	0.2±0.05	0.2±0.04
		Tb.N (1/mm)	4.2±0.4	4.0±0.3	4.3±0.7	3.9±0.5	3.7±0.1
		Tb.Sp (mm)	0.1±0.02	0.1±0.03	0.1±0.02	0.06±0.04	0.06±0.06
		Conn.D (1/mm ²)	52.5±26.6	36.0±11.8	49.0±14.1	13.4±21.7	17.7±9.7
Mechanical strength	Femur	Maximal load (N)	68.5±5.1	69.6±7.3	72.4±3.9	68.5±5.1	156.4±14.4*
		Stiffness (N/mm)	163.6±36.5	152.8±47.3	177.6±17.7	163.6±36.5	463.7±45.0*
	Tibia	Maximal load (N)	30.8±4.5	30.6±2.3	32.2±2.5	52.1±19.0	68.4±5.3
		Stiffness (N/mm)	31.1±10.0	33.6±6.3	33.5±8.03	60.2±13.8	61.2±13.3
	Vertebra	Maximal load (N)	113.4±23.5	102.4±17.7	105.2±16.2	167.4±31.8	204.4±45.1
		Stiffness (N/mm)	231.4±45.3	268.3±57.3	287.6±54.5	253.9±42.5	400.1±93.0*

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

Figure 5.