

ADAPTAÇÕES BIOMECÂNICAS DO OSSO CORTICAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À TRÊS DIFERENTES MODALIDADES DE EXERCÍCIO

BIOMECHANICAL ADAPTATIONS OF MICE CORTICAL BONE SUBMITTED TO THREE DIFFERENT EXERCISE MODALITIES

FERNANDO TADEU TREVISAN FRAJACOMO¹, MAURÍCIO JOSÉ FALCAI¹, CLEVERSON RODRIGUES FERNANDES¹, ANTONIO CARLOS SHIMANO¹, SÉRGIO BRITTO GARCIA²

RESUMO

Objetivo: Comparar os efeitos adaptativos de três modalidades de exercício de impacto reduzido nas adaptações mecânicas do osso cortical. Métodos: Vinte e quatro camundongos machos, espécie Balb/c (25±3g), foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=6): grupo sedentário (S); grupo natação (N) realizado cinco vezes por semana, 60 minutos progressivos; grupo resistido (R) submetido ao exercício de escalada com sobrecarga progressiva, três vezes por semana; e o grupo combinado (C) que realizou os mesmos protocolos em dias alternados sendo três vezes na semana do protocolo N e duas vezes na semana protocolo R. Após o sacrifício dos animais, foi realizado o ensaio mecânico de flexão em três pontos na tíbia dos grupos experimentais para se determinar a rigidez e a força máxima de fratura. Resultados: A rigidez nos grupos N (41,68 ± 10,43 N/mm) e R (41,21 ± 11,38 N/mm) foi significativamente maior comparada ao grupo S (28,48 ± 7,34 N/mm), $p < 0,05$. Entretanto, considerando a massa corporal final dos animais como variável, valores relativos, não houve diferença significativa nos testes biomecânicos do osso. Conclusões: Dados do presente estudo evidenciaram que o estímulo mecânico gerado pela contração muscular das modalidades isoladas de baixo impacto, grupo N e R, favoreceu o coeficiente absoluto de rigidez óssea, fato que não ocorreu na modalidade combinada, grupo C. **Nível de Evidência II, Estudo Prospectivo e Comparativo.**

Descritores: Exercício. Biomecânica. Tíbia. Camundongos.

ABSTRACT

*Objective: To compare the adaptive effects of three non-weight bearing exercise on bone mechanical properties. Methods: 24 male Balb/c mice (22-25g), were randomly divided into four groups (n=6): sedentary group (S); swimming group (N) which performed sessions five times per week for 60 min progressively; resistance group (R), which performed climbing exercise with progressive load, three times per week; and combined group (C), which performed the same protocols aforementioned being three times a week according to N protocol and two times a week the R protocol during eight weeks. Bio-mechanical tests, load until failure and stiffness evaluation of shinbone was performed after animals have been sacrificed. Results: Stiffness values were statistically higher only in the isolated modalities groups (N and R, 41.68 ± 10.43 and 41.21 ± 11.38 N/mm, respectively) compared with the S group (28.48 ± 7.34 N/mm). However, taking into consideration the final body mass, relative values, there was no difference in the biomechanical tests among the groups. Conclusion: Data from the present investigation demonstrated a favorable influence of muscle contraction in lower impact isolated exercise modalities on absolute stiffness values, i.e. groups N and R, whereas the combined group (C) did not present any statistically significant difference compared to the sedentary group. **Level of Evidence II, Prospective Comparative Study.***

Keywords: Exercise. Biomechanics. Tibia. Mice.

Citação: Frajacomo FTT, Falcai MJ, Fernandes CR, Shimano AC, Garcia SB. Adaptações biomecânicas do osso cortical de camundongos submetidos à três diferentes modalidades de exercício. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(6):328-32. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Frajacomo FTT, Falcai MJ, Fernandes CR, Shimano AC, Garcia SB. Biomechanical adaptations of mice cortical bone submitted to three different exercise modalities. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2013;21(6):328-32. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

A influência da atividade física na dinâmica do tecido ósseo tem provocado um crescente interesse da comunidade científica, em especial no tratamento e na prevenção do risco de fraturas decorrentes da osteoporose.¹ Evidenciou-se que a estrutura óssea

se adapta ao tipo de carga mecânica aplicada² e que o exercício físico atuaria como um agente promotor da carga mecânica no tecido ósseo.^{3,4} Modelos experimentais de alto impacto como as atividades de saltos demonstraram benefícios às propriedades mecânicas do osso, especialmente pelos ganhos de massa

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

2. Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Correspondência: Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 14049-900. Ribeirão Preto, SP, Brasil – Campus Universitário. ferfrajacomo@yahoo.com.br

óssea.^{5,6} No entanto, modalidades de exercício com impacto reduzido mostram que os mecanismos de adaptação óssea poderiam diferir das modalidades de alto impacto.⁷⁻⁹

O ensaio mecânico do tecido ósseo permitiu evidenciar com maior precisão um potencial das atividades com impacto reduzido ou sem impacto na manutenção e na melhoria das propriedades do tecido ósseo em resposta a essas atividades.^{10,11} Além disso, o tecido ósseo de camundongos machos submetidos ao treinamento de natação apresentou boa sensibilidade aos estímulos desencadeados pelo exercício.¹² Embora o mecanismo não esteja completamente elucidado, especulou-se que a resposta osteogênica ao exercício de impacto reduzido era influenciada pela interação mecânica entre o osso e a contração muscular sinalizando uma cascata de eventos ao metabolismo ósseo, dentre eles a elevação dos níveis de cálcio intracelulares, fatores de crescimento e o aumento da produção de matriz óssea.¹³

Os programas de exercício físico compostos por modalidades de exercício aeróbico e resistido são recomendados pelo Colégio Americano de Medicina Esportiva (ACSM) como estratégias de prevenção e tratamento para diversas populações.¹⁴ Modelos experimentais de natação e de exercício resistido já observaram adaptações distintas a cada modelo de treinamento sobre as propriedades mecânicas do tecido ósseo.¹⁵ Contudo não há evidências do efeito da modalidade combinada sobre essas propriedades. Exercício combinado é definido como a inclusão das modalidades aeróbico e resistido realizados sequencialmente (concorrente) ou em sessões alternadas (combinado).^{16,17} Muitos atletas e programas de reabilitação utilizam essa estratégia de exercício na expectativa de maximizar as adaptações fisiológicas específicas ofertadas por cada modalidade.¹⁷ No entanto, a superioridade ou a eficácia do modelo de exercício combinado sobre os marcadores fisiológicos permanecem incertos.^{18,19}

Além disso, sob o ponto de vista metabólico e neuromuscular, o modelo de exercício combinado realizado em sequência (concorrente) apresentou vias de sinalização celulares distintas ou até mesmo antagonicas quando comparados às modalidades isoladas,^{20,21} demonstrando um fenômeno previamente descrito por Hickson²² como “interferência” entre eles. Nesse sentido, foi evidenciado que a realização de ambas as modalidades separadas por um período de repouso de pelo menos 6-8 horas permitia a recuperação dos estoques de glicogênio e reduzia a fadiga residual.²³ Logo, uma melhor compreensão dessas modalidades de exercício sobre o tecido ósseo irá favorecer a prescrição de exercício para diversas populações, especialmente as de maior risco à fraturas. Nesse sentido, propusemos investigar e comparar os efeitos adaptativos das modalidades de exercício de natação, resistido e seu efeito combinado realizado em dias alternados (24h de repouso) sobre as propriedades biomecânicas do tecido ósseo de camundongos saudáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram obtidos 24 camundongos machos da espécie Balb/c, pesando inicialmente 25g ($\pm 3g$) fornecidos pelo Biotério Central do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Cetea/FMRP (protocolo nº 13/2011). Os animais foram randomizados em quatro grupos ($n=6$). Sendo grupo sedentário (S), o grupo exercício natação (N), o grupo exercício resistido (R) e o grupo exercício combinado (C). Todos os animais foram acomodados em gaiolas específicas para camundongos, ciclo dia e noite de 12h, e uma temperatura média controlada de 22°C.

PROTÓCOLOS DE EXERCÍCIO

Protocolo de natação

Os animais do grupo N realizaram exercício de natação em reservatórios adaptados à prática da mesma com temperatura da água mantida em 32 ($\pm 1^\circ\text{C}$). O treinamento de natação consistia de um incremento semanal de 20 min até 60 min minutos atingidos na terceira semana e mantido ao longo do protocolo, cinco dias por semana durante oito semanas, sem a inclusão de carga adicional, adaptado de Venditti e Di Meo.²⁴ A natação foi selecionada por apresentar-se como um ambiente natural dos roedores e por gerar menor interferência do impacto com o solo e dessa forma interferir na interpretação dos resultados.²⁵

Protocolo de exercício resistido

O equipamento de exercício resistido consistiu em um aparato de escalada (80° de inclinação, 1 cm de espaço entre cada degrau e 0,5m de altura) na qual os animais eram adaptados a subir (escalar). A dimensão vertical da escada permitiu com que os animais realizassem entre 8-12 movimentos dinâmicos, preservando o modelo original realizado em ratos.²⁶ Os parâmetros do protocolo utilizado correspondeu a seis a oito escaladas (repetições), com dois minutos de intervalo entre cada repetição, três sessões intercaladas por semana durante oito semanas (24 sessões). Na primeira semana, os animais foram acostumados ao equipamento de escalada sem nenhum peso adicional. Na segunda semana do protocolo, foi iniciado o teste para determinação da carga inicial treinamento, semelhante a um teste de carga máxima em humanos. Para tal, um peso adicional referente a 50% do peso corporal foi acoplado à porção proximal da cauda do animal por uma tira elástica de látex (Fulgor[®]) e nas repetições seguintes uma carga referente a 75, 90 e 100% do peso corporal foi utilizada. Após essa intensidade, uma carga de 3g era adicionada até a falha da execução. A falha era considerada a incapacidade do animal em atingir o topo do equipamento. A partir da determinação da carga máxima inicial considerando o peso corporal, a carga da sessão seguinte correspondia a 50% da carga máxima da última sessão seguidos por 75%, 90%, 100%, 100% + 3.0 g até a falha ou por atingir o máximo de oito repetições.²⁷

Protocolo de exercício combinado

O grupo submetido ao protocolo combinado realizou sessões intercaladas em dias alternados na semana sendo três vezes do protocolo do grupo N e duas vezes na semana o protocolo do grupo R, durante oito semanas. Ao final, os animais do grupo C realizaram 24 sessões do protocolo N intercalados com 16 sessões do protocolo R. Os animais não treinavam nos fins de semana.

Ensaio mecânico

Os ensaios mecânicos foram realizados em uma máquina universal de ensaios (Emic[®]), modelo DL 10000, no Laboratório de Bioengenharia da FMRP/USP. A velocidade de aplicação de carga foi de 1mm/min, com pré-carga de 1N, célula de carga de 500N tempo de acomodação de 30s e uma distância entre os pontos de 10mm. (Figura 1)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para determinarmos se a distribuição dos mesmos era paramétrica ou não paramétrica. Em se tratando de uma distribuição paramétrica, os dados foram submetidos ao teste *One-Way* ANOVA, seguidos do pós-teste de Tukey. Em se tratando de uma distribuição não-paramétrica, o teste *One-way* ANOVA era seguido do pós-teste de Dunn's. Para cada análise, foi utilizado o *Software GraphPad Prism V 5.1*. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

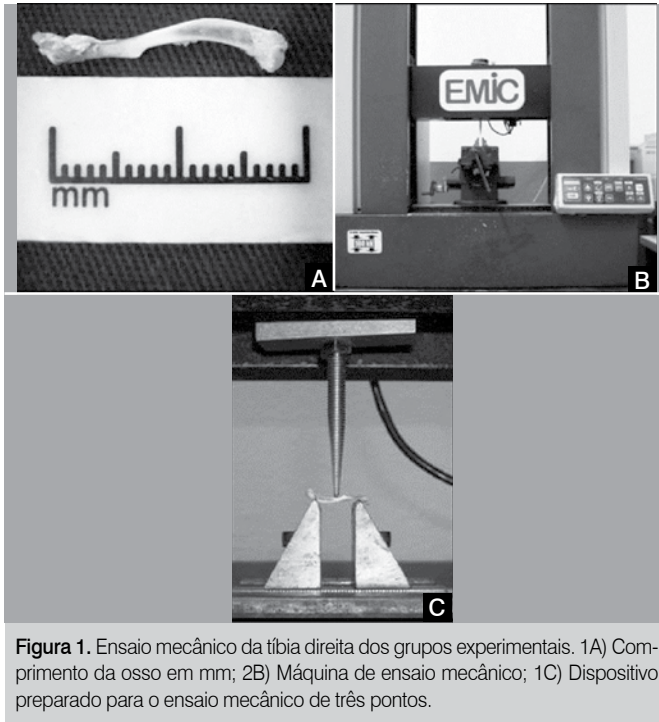


Figura 1. Ensaio mecânico da tíbia direita dos grupos experimentais. 1A) Comprimento da osso em mm; 2B) Máquina de ensaio mecânico; 1C) Dispositivo preparado para o ensaio mecânico de três pontos.

RESULTADOS

Massa Corporal

O teste de normalidade dos valores obtidos no experimento revelou uma distribuição paramétrica dos mesmos. Apesar de não haver diferença significativa da média de massa corporal dos grupos ao início do experimento, houve diferenças significativas no peso final dos grupos. (Figura 2) Se comparado ao grupo S, o peso corporal final dos grupos submetidos aos protocolos N e R foram maiores (10,19%) e (14, 96%), respectivamente. Contudo, somente o grupo R apresentou diferença significativa comparado ao grupo S, $p < 0,05$, enquanto o grupo C reduziu em 3,05% seu peso corporal em relação ao grupo S.

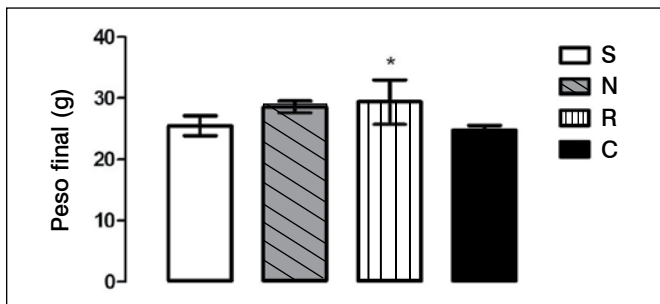


Figura 2. Massa corporal final dos grupos, valores expressos em média \pm desvio padrão, $n=6$. (S) grupo sedentário; (N) grupo natação; (R) grupo resistido; (C) grupo combinado.

Força Máxima

Após oito semanas do protocolo de treinamento específico para cada grupo, a média dos valores de força máxima absoluta foram: (10,40 \pm 2,37) N para o grupo S, (12,14 \pm 1,87) N para o grupo N, (13,72 \pm 3,2) N para o grupo R e (10,63 \pm 1,67) N para o grupo C. Apesar do aumento (15,72%) e (30,79%) nos protocolos de natação e resistido isolados, respectivamente, não foi evidenciado

diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$. (Figura 3) Diferença que se manteve inalterada pela padronização da massa corpórea final, força máxima relativa, $p > 0,05$. (Figura 3)

Rigidez

As médias dos valores de rigidez absoluta encontrados foram: (26,49 \pm 6,13) N/mm para o grupo S, (41,68 \pm 10,43) N/mm para o grupo N, (41,21 \pm 11,38) N/mm para o grupo R e (35,34 \pm 2,97) N/mm para o grupo C. A análise estatística mostrou que houve um aumento significativo dos grupos N e R comparada ao grupo S, $p < 0,05$. No entanto, os valores de rigidez relativa não revelaram diferença estatística entre os grupos, $p > 0,05$. (Figura 4)

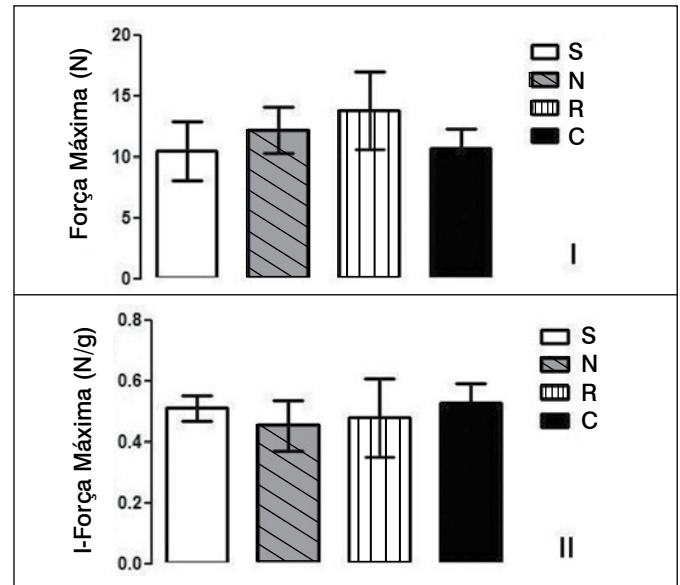


Figura 3. valores da força máxima (I) e do índice de força máxima corrigido pelo peso corporal (II). Valores expressos em média \pm desvio padrão, $n=6$. (S) grupo sedentário; (N) grupo natação; (R) grupo resistido; (C) grupo combinado.

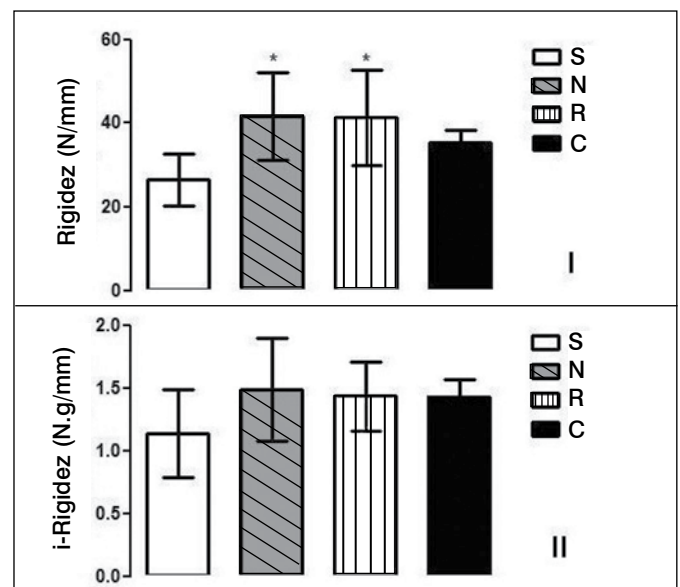


Figura 4. Valores da rigidez (I) e do índice de rigidez corrigido pelo peso corporal (II). Valores expressos em média \pm desvio padrão, $n=6$. (S) grupo sedentário; (N) grupo natação; (R) grupo resistido; (C) grupo combinado.* $p < 0,05$ em comparação ao grupo S.

DISCUSSÃO

É reconhecido que as propriedades mecânicas dos ossos podem ser precisamente mensuradas pelos ensaios mecânicos com aplicações de carga em compressão, flexão, torção e flexão-compressão. No presente estudo, a qualidade óssea foi analisada por meio da força máxima e rigidez, absolutas e relativas da tíbia, obtidos pelo teste biomecânico de flexão de três pontos. Nossos dados mostraram que os grupos N e R obtiveram um aumento dos valores de rigidez absoluta. Entretanto, o grupo C não demonstrou efeitos significativos sobre tais propriedades mensuradas quando comparados ao grupo S.

A prescrição de exercício físico aeróbio e resistido é recomendada pelo ACSM e pelo AHA.¹⁴ Contudo, há poucas conclusões a respeito dos mecanismos de interação e sinalização celular para a modalidade de exercício combinada, especialmente no tecido ósseo. O efeito "concorrente" dessa modalidade sobre o desenvolvimento de hipertrofia muscular já foi previamente investigado.^{28,29} A fosforilação da enzima adenosina-monofosfato-proteína-quinase ativada (AMPK) que atua como regulador do metabolismo energético do musculoesquelético é apontado como agente capaz de bloquear a cascata de síntese proteica mediada pela via do Akt/mTOR no treinamento concorrente.³⁰ Neste estudo observamos que a intervenção pelo treinamento combinado não diferiram do grupo S sobre as propriedades biomecânicas do tecido ósseo, corroborando com a teoria de uma possível interferência das vias de sinalização nessa modalidade repercutindo também nas adaptações mecânicas do tecido ósseo. Essas evidências sugerem um reduzido efeito adaptativo do treinamento combinado sobre o metabolismo ósseo (ex: relação entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos). Contudo, sugerimos que mais estudos possam investigar essas possíveis vias de interação na modalidade combinada e sua repercussão no metabolismo ósseo.

Foi observado que somente o grupo R apresentou uma maior massa corporal final se comparado ao grupo controle. Logo, ao consideramos essa variável na interpretação dos resultados (valores relativos), os valores de força máxima e rigidez entre os grupos não demonstraram diferença significativa. Estudos prévios com ratos da espécie Wistar consideraram que a massa corporal foi uma variável estatisticamente relevante³¹ e que animais mais pesados da mesma espécie obtiveram maiores valores de força máxima, rigidez e geometria de secção transversal.³² No entanto, análises tridimensionais desses ossos dos animais mais pesados revelaram que os ganhos mecânicos de força e rigidez ocorreram em resposta ao efeito mecano-estático que favoreceu uma maior área de secção transversa, ao passo que a qualidade mineral cortical estava inversamente comprometida. Em nosso modelo de estudo com camundongos sugere uma relação direta entre a

massa corporal final e os valores de rigidez absoluta, (Figura 3) embora não podemos afirmar que a qualidade mineral óssea dos grupos submetidos aos protocolos isolados tenha seguido essa mesma relação. Testes biomecânicos no tecido ósseo de pequenos roedores, em particular camundongos, apresentam um menor número de evidências se comparados aos ratos, possivelmente pela intrínseca limitação metodológica do ensaio mecânico do osso de camundongos.³³ Contudo, esses animais apresentam a vantagem natural de conduzir o teste de fratura de três ou quatro pontos mais uniformemente ao longo do tecido ósseo, acelerado processo de senescência e maior homogeneidade na espécie o que contribui para o reduzido número de cobaias.^{34,35} Modelos animais submetidos a atividades sem impacto já demonstraram que o estímulo mecânico gerado pela contração muscular é capaz de favorecer a qualidade mineral óssea.^{11,36} O resultado seria uma adaptação na sua estrutura trabecular favorecendo a resistência contra as cargas de tensão.³⁷ Nosso estudo apresenta algumas limitações metodológicas como a ausência de uma técnica de imagem como a Micro-CT ou a histomorfometria para confirmar as adaptações à estrutura trabecular. Além disso, os grupos N, R e C apresentaram um volume total de exercício distinto ao final do estudo. Tais limitações requerem cautela na interpretação do presente estudo. Podemos propor, todavia, que as adaptações mecânicas promovidas pelas diferentes modalidades de exercício ou pelo ganho de peso corporal sejam significativas, porém estruturalmente distintas.

CONCLUSÃO

Em suma, a análise biomecânica do presente estudo destacou que as adaptações mecânicas às modalidades de natação e exercício resistido isoladas não se repetiram na modalidade de exercício combinada e que a massa corporal final exerceu um fator de destaque nessa interpretação. Nesse sentido, nossos dados indicam para uma redução dos efeitos adaptativos na modalidade que combina os exercícios de impacto reduzido sobre a resistência óssea às fraturas. Além disso, apontamos para futuras investigações sobre a relevância do peso corporal na interpretação das adaptações biomecânicas do tecido ósseo em modelos animais e estudos clínicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e aos departamentos de Patologia e Medicina Legal e ao Departamento de Biomecânica e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP-USP pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

1. Marcus R. Role of exercise in preventing and treating osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001;27(1):131-41.
2. Bloomfield SA. Cellular and molecular mechanisms for the bone response to mechanical loading. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism.* 2001;11(Suppl):S128-36.
3. Skerry TM. Mechanical loading and bone: what sort of exercise is beneficial to the skeleton? *Bone.* 1997;20(3):179-81.
4. Turner CH, Robling AG. Mechanisms by which exercise improves bone strength. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(Suppl):16-22.
5. Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Shimizu T, Umemura Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. *J Appl Physiol.* 2003;95(3):1032-7.
6. Umemura Y, Nagasawa S, Sogo N, Honda A. Effects of jump training on bone are preserved after detraining, regardless of estrogen secretion state in rats. *J Appl Physiol.* 2008;104(4):1116-20.
7. Fehling PC, Alekel L, Clasey J, Rector A, Stillman RJ. A comparison of bone mineral densities among female athletes in impact loading and active loading sports. *Bone.* 1995;17(3):205-10.
8. Emslander HC, Sinaki M, Muhs JM, Chao EY, Wahner HW, Bryant SC, et al. Bone mass and muscle strength in female college athletes (runners and swimmers). *Mayo Clin Proc.* 1998;73(12):1151-60.
9. Melton SA, Hegsted M, Keenan MJ, Morris GS, O'Neil CE, Zablach-Pimentel EM. Water exercise prevents femur density loss associated with ovariectomy in the retired breeder rat. *J Strength Cond Res.* 2004;18(3):508-12.
10. Renno AC, Silveira Gomes AR, Nascimento RB, Salvini T, Parizoto N. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. *Exp Gerontol.* 2007;42(6):517-22.
11. Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol.* 2001;91(4):1663-8.
12. Hoshi A, Watanabe H, Chiba M, Inaba Y. Bone density and mechanical

- properties in femoral bone of swim loaded aged mice. *Biomed Environ Sci*. 1998;11(3):243-50.
13. Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M, Promenzio L, Tarantino U, De Lorenzo A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(4):507-11.
 14. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. 2011;43(7):1334-59.
 15. Aguiar AF, Agati LB, Muller SS, Pereira OC, Dal-Pai-Silva M. Efeitos do treinamento físico sobre a resistência mecânica do terço proximal do fêmur de ratos. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(5):245-9.
 16. Glowacki SP, Martin SE, Maurer A, Baek W, Green JS, Crouse SF. Effects of resistance, endurance, and concurrent exercise on training outcomes in men. *Medicine and science in sports and exercise*. 2004;36(12):2119-27.
 17. Leveritt M, Abernethy PJ, Barry BK, Logan PA. Concurrent strength and endurance training. A review. *Sports Med*. 1999;28(6):413-27.
 18. Cornelissen VA, Smart NA. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(1):e004473.
 19. Pattyn N, Cornelissen VA, Eshghi SR, Vanhees L. The effect of exercise on the cardiovascular risk factors constituting the metabolic syndrome: a meta-analysis of controlled trials. *Sports Med*. 2013;43(2):121-33.
 20. Baar K. Training for endurance and strength: lessons from cell signaling. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38(11):1939-44.
 21. Hakkinen K, Alen M, Kraemer WJ, Gorostiaga E, Izquierdo M, Rusko H, et al. Neuromuscular adaptations during concurrent strength and endurance training versus strength training. *Eur J Appl Physiol*. 2003;89(1):42-52.
 22. Hickson RC. Interference of strength development by simultaneously training for strength and endurance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1980;45(2-3):255-63.
 23. Garcia-Pallares J, Sanchez-Medina L, Carrasco L, Diaz A, Izquierdo M. Endurance and neuromuscular changes in world-class level kayakers during a periodized training cycle. *Eur J Appl Physiol*. 2009;106(4):629-38.
 24. Venditti P, Di Meo S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys*. 1996;331(1):63-8.
 25. Burneiko RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GM, Faine LA, et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol*. 2006;44(7):1167-72.
 26. Hornberger TA Jr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 2004;29(1):16-31.
 27. Matheny RW, Merritt E, Zannikos SV, Farrar RP, Adamo ML. Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234(2):164-70.
 28. Nader GA. Concurrent strength and endurance training: from molecules to man. *Medicine and science in sports and exercise*. 2006;38(11):1965-70.
 29. Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J*. 2005;19(7):786-8.
 30. Hawley JA. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009;34(3):355-61.
 31. Huang TH, Hsieh SS, Liu SH, Chang FL, Lin SC, Yang RS. Swimming training increases the post-yield energy of bone in young male rats. *Calcif Tissue Int*. 2010;86(2):142-53.
 32. Di Masso RJ, Font MT, Capozza RF, Detarsio G, Sosa F, Ferretti JL. Long-bone biomechanics in mice selected for body conformation. *Bone*. 1997;20(6):539-45.
 33. Vashishth D. Small animal bone biomechanics. *Bone*. 2008;43(5):794-7.
 34. Wallace JM, Rajachar RM, Allen MR, Bloomfield SA, Robey PG, Young MF, et al. Exercise-induced changes in the cortical bone of growing mice are bone- and gender-specific. *Bone*. 2007;40(4):1120-7.
 35. Maloul A, Rossmeyer K, Mikic B, Pogue V, Battaglia T. Geometric and material contributions to whole bone structural behavior in GDF-7-deficient mice. *Connect Tissue Res*. 2006;47(3):157-62.
 36. Warner SE, Shea JE, Miller SC, Shaw JM. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif Tissue Int*. 2006;79(6):395-403.
 37. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol*. 2003;95(1):300-7.