

### HORMÔNIO DO CRESCIMENTO VERSUS TREINAMENTO DE FORÇA: ALTERAÇÕES NAS ESTRUTURAS COLÁGENAS, LIPÍDICAS E GLICÍDICAS

Robson Chacon Castoldi<sup>1,2</sup>, Henrique Izaías Marcelo<sup>1</sup>, Andressa Eulina da Cruz Félix<sup>1</sup>, Jonathan Borges Peixoto Silva<sup>1</sup>, Heliard Rodrigues dos Santos Caetano<sup>1</sup>, Thiago Alves Garcia<sup>3</sup>, Guilherme Akio Tamura Ozaki<sup>3</sup>, Inês Cristina Giometti<sup>1</sup>, José Carlos Silva Camargo Filho<sup>2</sup>, William Dias Belangero<sup>3</sup>.

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de hormônio do crescimento (*Growth Hormone - GH*) e treinamento de força (TF) na composição do tecido ósseo de ratos Wistar a partir da Espectroscopia Raman. 40 ratos machos foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos: controle (C [n=10]), controle a aplicação de GH (GHC [n=10]), treinamento de força (T [n=10]) e treinamento de força e aplicação de GH (GHT [n=10]). O treinamento foi composto por quatro séries de 10 saltos aquáticos, realizados três vezes por semana, com sobrecarga correspondente a 50% do peso corpóreo e duração de quatro semanas. O GH foi aplicado na dose de 0,2 UI/Kg em cada animal, três vezes por semana e em dias alternados. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e coletados os fêmures direitos para realização da análise da composição óssea. A espectroscopia Raman (ER) foi utilizada para observar os seguintes compostos a partir de suas respectivas bandas: colágeno e fosfolípido (1445 cm<sup>-1</sup>), colesterol (548 cm<sup>-1</sup>), glicerol (607 cm<sup>-1</sup>), glicose (913 cm<sup>-1</sup>), Pico de carboidrato (931 cm<sup>-1</sup>) e prolina (918 cm<sup>-1</sup>). Para a análise estatística, foram realizados os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e análise de variâncias ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados revelaram aumento nas concentrações de colágeno e fosfolípido, colesterol, glicerol, glicose, pico de carboidrato e prolina em todos os grupos experimentais, associados ou não à realização do ST e/ou aplicação de GH. Porém, somente o grupo T diferiu significativamente do grupo C (p<0,05). Conclui-se que todas intervenções puderam promover ganho no tecido ósseo, porém, somente o grupo T demonstrou diferença significativa nos compostos minerais analisados.

**Palavras-chave:** exercício físico; espectroscopia; fêmur; anabolismo.

#### Afiliação

<sup>1</sup>Departamento de Educação Física. Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE.

<sup>2</sup>Departamento de Fisioterapia. Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente – FCT/UNESP.

<sup>3</sup>Departamento de Ortopedia e Traumatologia. Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP.

# **GROWTH HORMONE (GH) VERSUS STRENGTH TRAINING: CHANGES IN COLLAGEN, LIPID AND GLUCIDIC STRUCTURES**

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the effect of the application of growth hormone (GH) and strength training (TF) on the bone tissue composition of Wistar rats using Raman Spectroscopy. 40 male rats were randomly assigned to four groups: control (C [n = 10]), control the application of GH (GHC [n = 10]), strength training (T [n = 10]) and training of strength and application of GH (GHT [n = 10]). The training consisted of four series of 10 water jumps, performed three times a week, with an overload corresponding to 50% of body weight and lasting four weeks. GH was applied at a dose of 0.2 IU / kg to each animal, three times a week and on alternate days. After four weeks, the animals were euthanized and the right femurs were collected to carry out the analysis of the bone composition. Raman spectroscopy (ER) was used to observe the following compounds from their respective bands: collagen and phospholipid (1445 cm<sup>-1</sup>), cholesterol (548 cm<sup>-1</sup>), glycerol (607 cm<sup>-1</sup>), glucose (913 cm<sup>-1</sup>), Peak carbohydrate (931 cm<sup>-1</sup>), proline (918 cm<sup>-1</sup>). For statistical analysis, the Shapiro-Wilk normality tests and ANOVA One-Way analysis of variances were performed, followed by the Tukey post-test. The results revealed an increase in the concentrations of collagen and phospholipid, cholesterol, glycerol, glucose, peak carbohydrate and proline in all experimental groups, associated or not with the performance of ST and / or application of GH. However, only group T differed significantly from group C (p < 0.05). It was concluded that all intervention could promote gain in bone tissue, however, only the T group showed a significant difference in the analyzed mineral compounds.

**Keywords:** physical exercise; spectroscopy; femur; anabolism.

## Introdução

A estrutura e a composição química do tecido ósseo tem a capacidade de se adaptar à diferentes estímulos, como, por exemplo, aplicação de substâncias anabólicas como o GH e alterações metabólicas causadas pelo treinamento físico<sup>1,2</sup>. A composição química e a estrutura cristalina do osso desempenham um papel essencial nas suas características biológicas e estruturais<sup>3-4</sup>.

O tecido ósseo pode ser descrito como um composto de uma matriz orgânica reforçada contendo uma fase mineral inorgânica<sup>4,5</sup>. A matriz orgânica é composta por cerca de 90% de colágeno tipo I orientadas localmente, paralelos entre si, fornecendo uma matriz de suporte em forma de cristais minerais<sup>6</sup>.

A fração mineral do osso é altamente impura apatita carbonada situada entre a fibrila de colágeno e ligações cruzadas e extremidades de fibrilas<sup>5</sup>. Tanto o orgânico quanto o mineral, os componentes e as interações entre os dois contribuem para as propriedades mecânicas dos ossos, incluindo força, dureza e elasticidade<sup>3-5</sup>.

Por sua vez, o treinamento de força (TF) promove uma sobrecarga mecânica sobre o osso e pode ser reconhecida como um importante regulador na força óssea<sup>7</sup>. Similarmente, acredita-se que o treinamento com pesos possa contribuir para preservação da massa óssea em indivíduos jovens e adultos, pois observa-se que o TF é um potente estimulador da liberação do GH, sobre influência de diversos fatores, em especial, da intensidade e do volume do exercício<sup>8</sup>.

Evidências experimentais demonstram que a aplicação do GH, juntamente ao treinamento de força, provoca diminuição da densidade mineral óssea<sup>9</sup>. Este acontecimento pode ser gerado pelo excesso de estímulo celular causado pela atuação anabólica do GH somada às adaptações celulares ao exercício<sup>1</sup>.

Baseando-se em estudos, existem duas hipóteses que explicam como o GH atua. A primeira delas é que o hormônio poderia agir diretamente nas células. Já segunda, é de que o GH chegaria ao fígado e tecidos periféricos, causando a liberação e produção dos fatores de crescimento tipo insulina (IGFs), que por sua vez aumentariam a quantidade de receptores para estes peptídeos, podendo prolongar a meia-vida dos IGFs<sup>1,8,10</sup>.

Nesse sentido, fez-se necessária a realização do presente estudo, pois existe a escassez estudos envolvendo o uso do TF e GH, não esclarecendo totalmente os efeitos

dos mesmos utilizados de forma conjunta. Desta forma, o presente estudo é de importante relevância, pois descreve as alterações impostas pelo GH e TF sobre moléculas do metabolismo tecidual ósseo, tema este que ainda carece de estudos na literatura.

Além disso, a espectroscopia Raman (ER) é uma técnica importante que possibilita a realização de investigações nas propriedades do tecido ósseo<sup>9,11</sup>. Esta técnica fornece espectros vibratórios ósseos e, como espectroscopia infravermelha, não é destrutiva, além disso fornece informações simultâneas sobre minerais ósseos e matriz orgânicas, e possui vantagens devido a sua aplicabilidade<sup>11</sup>.

Sendo assim o objetivo desse estudo foi verificar os efeitos do TF e ou aplicação do GH e suas alterações relacionadas às estruturas colágenas, lipídicas e glicídicas do tecido ósseo.

## **Materiais e métodos**

### **Uso de Animais**

Foram utilizados 40 animais machos, com 60 dias de idade, da linhagem Wistar. Os animais permaneceram em grupos de 05 animais por caixas plásticas com dimensões de 41x34x17,5 cm, com temperatura controlada (20 a 30°C), luminosidade (ciclo claro/escuro de doze horas) e umidade (55±15%) controlados, das 7 às 19 horas, com livre acesso à água e à ração da marca Supralab<sup>®</sup> (Supra, Empresa Alisul, Brasil). O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética local, no qual recebeu o número de aprovação CEUA – 2626.

### **Protocolos experimentais**

A amostra foi distribuída em quatro grupos: (40 ratos machos) sendo estes: controle (C [n=10]), controle GH (GHC [n=10]), treinamento de força (T [n=10]) e treinamento de força com a aplicação de GH (GHT [n=10]). Os animais foram submetidos antecipadamente a um período de adaptação ao meio líquido e equipamento (1x10 saltos; 2x10 saltos; 3x10 saltos), durante uma semana<sup>12</sup>. O período de treinamento foi composto por quatro semanas.

### **Protocolo de treinamento**

O protocolo de treinamento foi composto por quatro séries de 10 saltos, executado três vezes na semana em dias não consecutivos, em um recipiente cilíndrico de PVC, especialmente modificado para saltos na água, de profundidade apropriada ao comprimento dos animais (38 cm). Entre cada uma das séries de saltos foi estabelecido

intervalo de 1 minuto. A sobrecarga utilizada foi correspondente a 50% do peso corpóreo de cada animal e corrigido semanalmente. Para realização do treinamento, a sobrecarga foi acomodada na região anterior do tórax através de um colete (Figura 1)<sup>13,14</sup>.

### **Grupos experimentais**

Grupo C: Os animais ficaram livres em suas gaiolas com acesso irrestrito à água e alimentação, receberam solução fisiológica (0,9% de cloreto de sódio em água).

Grupo GHC: Os animais permaneceram livres em suas caixas com acesso irrestrito à água e alimentação. Além disso, foi administrada a quantidade de 0,2 UI/Kg de GH em cada animal, três vezes por semana, em dias alternados<sup>9</sup>.

Grupo T: Este grupo recebeu mesmo volume de solução fisiológica do grupo C (0,9% de cloreto de sódio em água) e realizou o protocolo de treinamento durante as quatro semanas.



**Figura 1.** Ilustra o treinamento realizado pelo animal.

Grupo GHT: Foi composto de forma idêntica ao protocolo de treinamento citado anteriormente, durante o mesmo período. Porém, assim como no caso do grupo GHC, foram administrados 0,2 UI/Kg de GH<sup>9</sup>, ao invés de solução fisiológica, em cada um dos animais. Imediatamente após a aplicação, os animais foram induzidos à realização do protocolo de treinamento de força.

### **Análise do Tecido Ósseo**

Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com éter etílico e

após a eutanásia, o fêmur do membro inferior direito foi retirado por meio de incisão longitudinal para remoção da pele e de partes moles. Após este procedimento, foi realizada a imersão em solução fisiológica e armazenada à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para a realização de análises posteriores.

A análise do conteúdo mineral ósseo foi realizada por Espectroscopia Raman com a utilização de microscópio Raman “espectrógrafo micro-Raman, marca Renishaw, modelo in-Via” surface-enhanced Raman scattering (Gloucestershire, Reino Unido). Nesse caso, foram mensuradas as alterações nas bandas correspondentes aos seguintes compostos: Colágeno e Fosfolipídeo, Colesterol, Glicerol, Carboidratos e Prolina (Tabela 1)<sup>15</sup>.

**Tabela 1.** Atribuições de bandas por espectroscopia Raman do tecido ósseo.

v [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Atribuição da banda
1445	Colágeno e fosfolipídeo
548	Colesterol
607	Glicerol
913	Glicose
931	Pico de carboidratos
918	Prolina

**Fonte:** Movasaghi et al., <sup>15</sup>.

Foi utilizado o laser com comprimento de onda de 633 nm com potência na amostra da ordem de microwatt ( $\mu\text{W}$ ) e a rede de difração foi de 1800 linhas por mm. O tempo de exposição adotado foi de 10s e a quantidade de acumulações foi igual a cinco.

A microscopia óptica foi obtida por microscópio óptico da marca Leica (série DMLM), acoplado ao espectrógrafo e objetiva com aumento de 50x fornecendo resolução espacial da ordem  $1,00 \mu\text{m}^2$ , detector CCD Peltier (resfriado a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) e plataforma motorizada XYZ (motor de passo –  $0,10 \mu\text{m}$ ) no qual foram posicionadas as amostras. Três espectros foram coletados de cada amostra, totalizando nove espectros por grupo.

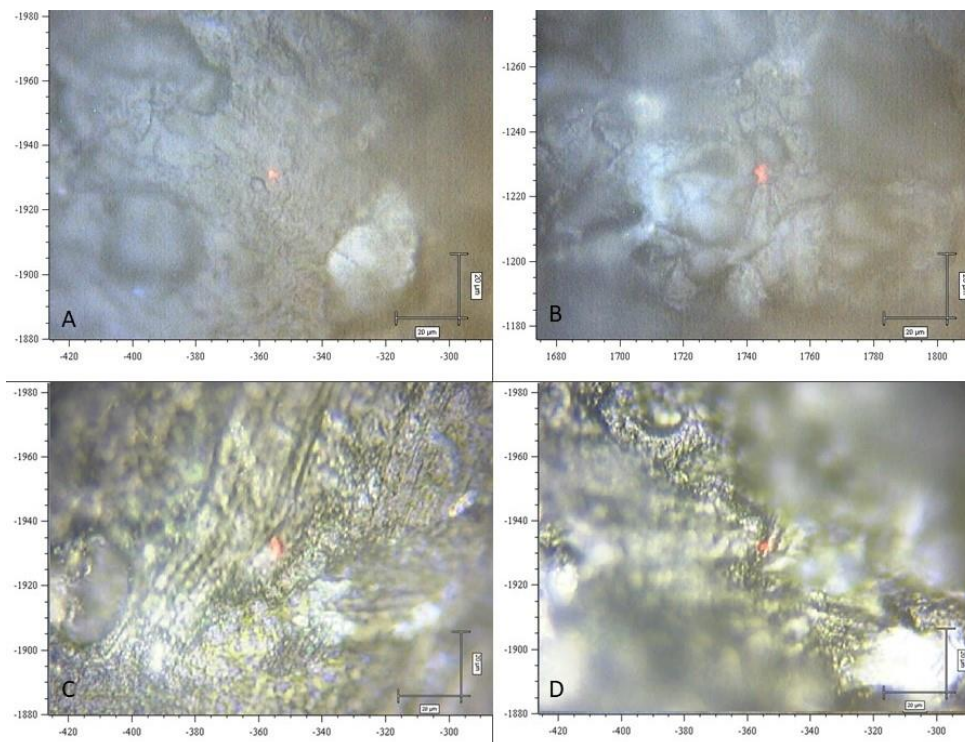
#### **Análise estatística**

Após a obtenção dos dados, foi verificada normalidade dos dados pelo teste de

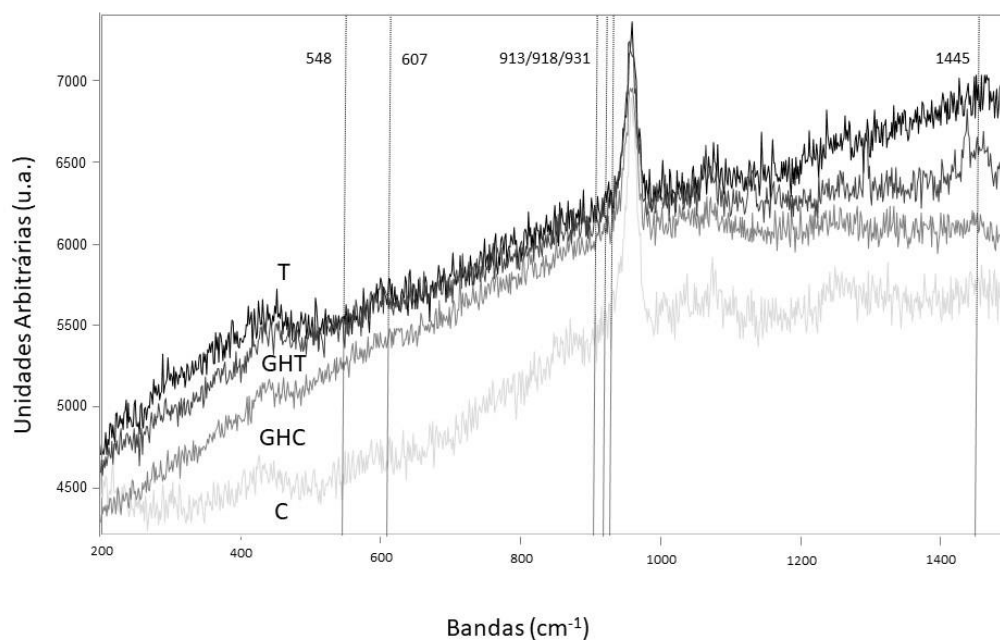
Shapiro-Wilk e, em seguida, aplicado o teste ANOVA unidirecional (one-way) para comparação entre médias com pós teste de Tukey. Todos os procedimentos utilizaram significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e foram realizados com o Software SPSS 22.0.

Foram utilizados no estudo 40 ratos machos Wistar, distribuídos em 4 grupos, controle (C); controle GH (GHC); treinamento de força (T); e treinamento de força com a aplicação de GH (GHT), ambos os grupos constituídos por 10 animais.

Após obtenção das imagens microscópicas do fêmur, foram verificadas diferentes morfologias no osso cortical (Figura 2). Além disso, a espectroscopia Raman demonstrou diferentes intensidades de pico nos diferentes grupos de animais (Figura 3).



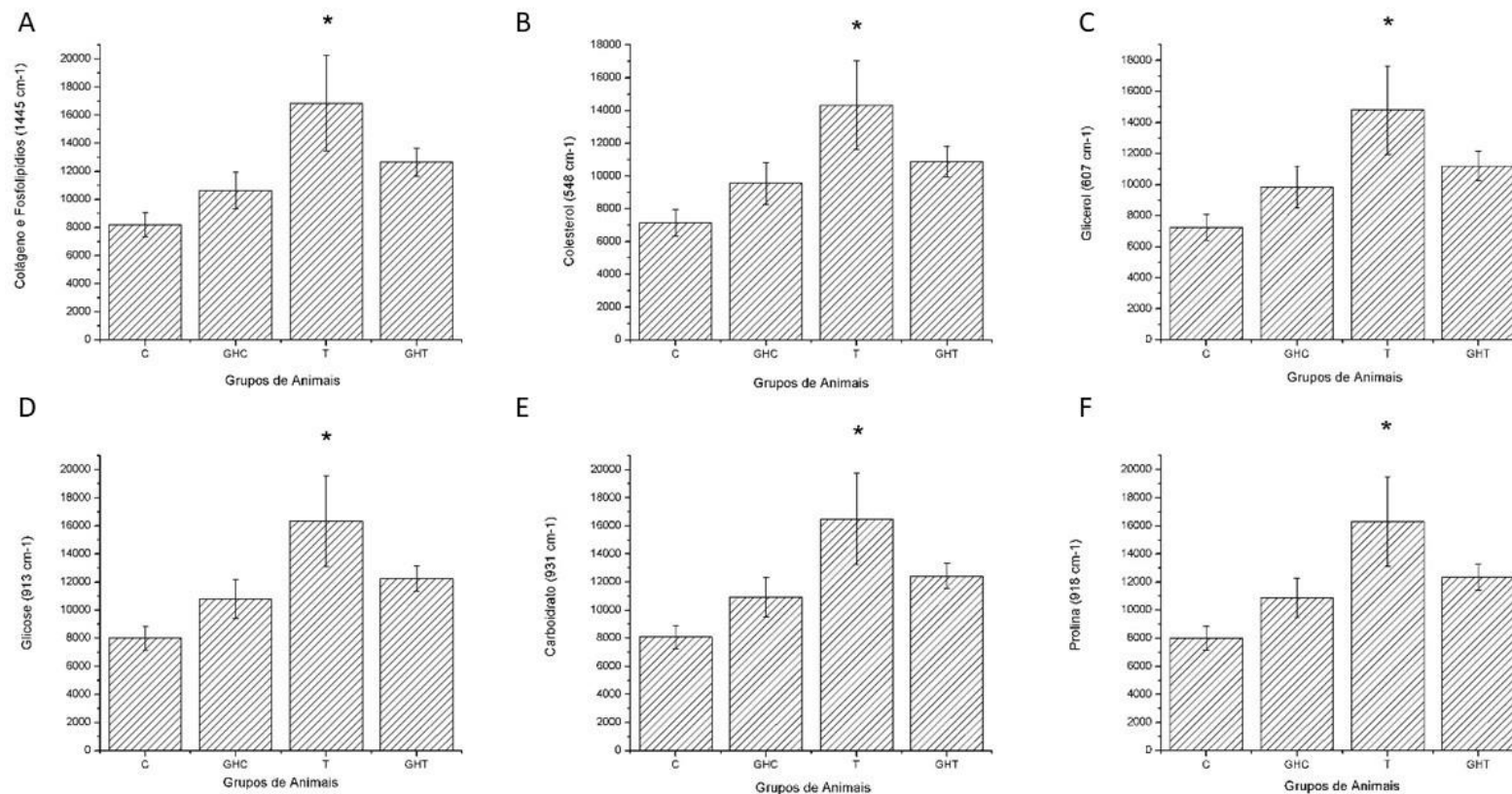
**Figura 2.** Imagens microscópicas do fêmur de ratos Wistar com aumento de 50x. A): Controle; B): Controle GH; C): Treinamento; D): Treinamento GH.



**Figura 3.** Intensidade de picos obtida pela Espectroscopia Raman em cada composto analisado. A): Controle; B): Controle GH; C): Treinamento; D): Treinamento GH.

Após análise da intensidade de picos, foi observado que o grupo de animais que realizou o treinamento de força isoladamente demonstrou maiores valores para os compostos analisados quando comparado aos demais grupos de animais ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, houve um comportamento semelhante para as variáveis colesterol -  $548,07 \text{ cm}^{-1}$  ( $14332,46 \pm 8105,92$ ), glicerol -  $607,13 \text{ cm}^{-1}$  ( $14804,24 \pm 8573,17$ ), glicose -  $913,45 \text{ cm}^{-1}$  ( $7993,23 \pm 2516,99$ ), prolina -  $918,17 \text{ cm}^{-1}$  ( $16321,67 \pm 16321,67$ ), carboidrato -  $931,56 \text{ cm}^{-1}$  ( $16486,61 \pm 9743,43$ ) e colágeno e Fosfolípídeos -  $1445,76 \text{ cm}^{-1}$  ( $16839,38 \pm 10214,74$ ) (Figura 4).





1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

**Figura 4 .** Alterações das estruturas colágenas, lipídicas e glicídicas. A) moléculas de Colágeno e Fosfolípidos; B) moléculas de Colesterol; C) moléculas de Glicerol; D) moléculas de Glicose; E) moléculas de Carboidratos; F) moléculas de Proteína Prolina. C: grupo controle; GHC: grupo controle com aplicação de hormônio do crescimento; T: grupo treinamento; GHT: grupo treinamento com aplicação de hormônio do crescimento. (\*): Diferença estatisticamente significativa a partir do teste de ANOVA one way com pós teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 9 Discussão

10 O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos do TF e ou aplicação do GH  
11 e suas alterações relacionadas às estruturas colágenas, lipídicas e glicídicas tecido ósseo.  
12 Os resultados revelaram que o grupo T, apresentou maiores valores para banda colesterol  
13 ( $548,07\text{ cm}^{-1}$ ), glicerol ( $607,13\text{ cm}^{-1}$ ), glicose ( $913,45\text{ cm}^{-1}$ ), prolina ( $918,17\text{ cm}^{-1}$ ),  
14 carboidrato ( $931,56\text{ cm}^{-1}$ ) e colágeno e Fosfolipídeos ( $1445,76\text{ cm}^{-1}$ ).

15 Vários métodos foram usados para estudar o tecido ósseo, no entanto, a maioria  
16 desses métodos não são suficientemente sensível para gerar informação a nível  
17 molecular<sup>16</sup>. Como é um sistema complexo, muitas variáveis podem afetar sua  
18 composição, formação, força e propriedades<sup>17</sup>.

19 Desta forma, o método utilizado no presente estudo a partir da analisa realizado  
20 pela Espectroscopia Raman, foi capaz de quantificar cada elemento presente no tecido  
21 ósseo<sup>15</sup>. Além disso, o TF influencia no aumento da reabsorção óssea, devido a  
22 intensidade de treinamento<sup>19</sup>. Os resultados obtidos no presente estudo, são  
23 consequências da aplicação de protocolo de TF, que gera estímulos osteogênicos, devido  
24 ao aumento do estresse mecânico aplicado sobre os ossos<sup>18</sup>.

25 Uma possível justificativa, para o levar ao aumento da densidade mineral óssea  
26 (DMO) a partir do TF é devido a presença de sinais bioquímicos, possivelmente  
27 decorrente da sobrecarga imposta osso<sup>20,21</sup>. Essa teoria é aplicada a qualquer deformação  
28 ou sobrecarga óssea causada por compressão, tensão, torção ou cisalhamento desse  
29 tecido. Essas ações mecânicas proporcionam diferenças no potencial elétrico exercido nos  
30 ossos, que agem como um campo elétrico, estimulador da atividade celular, levando à  
31 deposição de minerais nos pontos de estresse<sup>20</sup>.

32 Pesquisas evidenciam que o TF é um potente estimulador para promover aumento  
33 da densidade do tecido ósseo e seu remodelamento<sup>20</sup>. Assim, o mecanismo para o  
34 aumento da DMO por meio do TF passa pela magnitude da deformação óssea causada  
35 durante essa atividade<sup>18</sup>.

36 Um estudo mostrou que o treinamento aeróbio, utilizado por 90 dias, com  
37 intensidade de 60% da capacidade aeróbia máxima, possibilitou aumento da DMO em  
38 ratos Wistar de meia idade<sup>22</sup>. De fato, maiores intensidades de treino com cargas elevadas,  
39 geralmente estão associadas a maiores estímulos para o aumento na DMO, comparado  
40 com a de menores intensidades<sup>20,23-25</sup>. Além disso, estudos sugerem que outros fatores

41 como os níveis de testosterona, podem ser determinantes na massa óssea<sup>26</sup>.

42 Pesquisadores observaram-se que o exercício físico é um potente estimulador da  
43 liberação do GH, tendo como influência em especial, a intensidade e do volume do  
44 exercício<sup>8</sup>. Embora pesquisas demonstram que o protocolo de treinamento com natação  
45 não altera significativamente os níveis de GH em ratos diabéticos, este consegue otimizar  
46 o desenvolvimento ósseo nesses animais<sup>27</sup>.

47 No presente estudo, notou-se que o TF estimulou o aumento das concentrações de  
48 moléculas no tecido ósseo. Este fato pode ter ocorrido devido ao estímulo de produção de  
49 cálcio, amido e outras moléculas presentes nas células ósseas, bem como na conexão da  
50 matriz extracelular<sup>28,29</sup>. Além disso, estudos mostram que os estímulos celulares  
51 provocados pelo GH em combinação ao TF, podem acabar atenuando funções celulares  
52 relacionadas à secreção hormonal e no mecanismo de *feedback* negativo<sup>30</sup>.

53 Além do TF, a modalidade de treinamento aeróbio, tem se mostrado eficiente na  
54 contribuição da saúde óssea, restaurando a homeostase do tecido por meio de  
55 biomarcadores como fosfato alcalino ósseo e cálcio<sup>31</sup>. Dentro deste contexto, no estudo  
56 de Gomes et al.<sup>27</sup> que utilizou um protocolo de exercício aeróbio, verificou o aumento  
57 nos níveis de IGF-1. Por fim, pesquisas mostram que diversos efeitos promovidos pelo  
58 exercício físico são influenciados pelo GH, incluindo a redução do catabolismo proteico  
59 e a oxidação da glicose, concomitantemente ao aumento da mobilização de ácidos graxos  
60 livres do tecido adiposo para gerar energia<sup>1,32</sup>.

61 Sendo assim, o presente estudo colabora com a literatura ao verificar as alterações  
62 provocadas pelo treinamento de força muscular e GH pelo método de espectroscopia  
63 Raman. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas, como a dose utilizada  
64 na aplicação do hormônio e protocolo de treinamento. Vale ressaltar que os resultados  
65 foram verificados em ratos, portanto, não podem ser extrapolados em seres humanos.  
66 Estudos futuros, que investiguem diferentes formas de treinamento, assim como dosagens  
67 hormonais, podem vir a colaborar com os achados expostos nesta investigação.

68

## 69 **Conclusão**

70 Os resultados confirmam que, o TF isolado resultou em maiores concentrações de  
71 colágeno, fosfolipídio, colesterol, glicerol, glicose, pico de carboidratos e prolina, no  
72 tecido ósseo de ratos, quando comparado à aplicação do GH isolado ou em combinação

73 ao TF.

74

## 75 **Agradecimentos**

76 Agradecemos ao Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Análises  
77 Ambientais e Biológicas da Universidade Estadual Paulista – FCT/UNESP e à  
78 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio à  
79 pesquisa.

80

## 81 **Referências**

82

83 1. Cruzat VF, Donato Júnior J, Tirapegui J, Schneider CD. Growth hormone and  
84 physical exercise: current considerations. **Brazilian J Pharm Sci.** 2008;44(4):549–  
85 562. Doi:10.1590/S1516-93322008000400003

86 2. Castoldi RC, Louzada MJQ, Oliveira BRSM, Ozaki GAT, Koike TE, Garcia TA  
87 et al. Effects of aerobic, anaerobic, and concurrent training on bone mineral density  
88 of rats. **Motriz: J. Phys. Ed.**, 2017;23(1):71-75. Doi:10.1590/s1980-  
89 6574201700010011

90 3. Lui JC, Colbert M, Cheung CSF et al. Cartilage-targeted IGF-1 treatment to  
91 promote longitudinal bone growth. **Mol Ther.** 2019;17(3):673-680.  
92 Doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.017.

93 4. Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar Bone: Structure–Function Relations. **J**  
94 **Struct Biol.** 1999;126(3):241–55. Doi:10.1006/jsbi.1999.4107

95 5. Carmejane O, Morris MD, Davis MK, Stixrude L, Tecklenburg M, Rajachar RM, et  
96 al. Bone Chemical Structure Response to Mechanical Stress Studied by High  
97 Pressure Raman Spectroscopy. **Calcif Tissue Int.** 2005;76(0):207–213. Doi:  
98 10.1007/s00223-004-0168-z

99

100 6. Riminucci, M., & Bianco, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in  
101 physiology and biotechnology. **Brazilian Journal of Medical and Biological**  
102 **Research**, 2003;36(8):1027-1036. Doi:10.1590/S0100-879X2003000800008

103 7. Aguiar F, Agati B, Swain Müller S, Pereira C, Dal-Pai-Silva M. Effects of physical  
104 training on the mechanical resistance of rat Femur proximal thirds. **Acta Ortop**  
105 **Bras** 2010;18(5):245–9. Doi:10.1590/S1413-78522010000500002.

106 8. Kraemer WJ, Flanagan SD, Volek JS et al. Resistance exercise induces region-  
107 specific adaptations in anterior pituitary gland structure and function in rats. **J Appl**  
108 **Physiol.** 2013;115(0):1641–1647. Doi:10.1152/jappphysiol.00687.2013.

109 9. Castoldi, R.C., Ozaki, G.A.T., Garcia, T.A. et al. Effects of muscular strength  
110 training and growth hormone (GH) supplementation on femoral bone tissue:

- 111 analysis by Raman spectroscopy, dual-energy X-ray absorptiometry, and mechanical  
112 resistance. *Lasers Med Sci.* 2020;35(2):345–354 (2020). Doi:10.1007/s10103-019-  
113 02821-5
- 114 10. Holt R, Erotokritou-Mulligan I, Sönksen PH. The history of doping and growth  
115 hormone abuse in sport. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19(4):320–326.  
116 Doi:10.1016/j.ghir.2009.04.009.  
117
- 118 11. Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of  
119 mineralized tissues (review). *J Biomed Opt.* 2000;5(3):259–268.  
120 Doi:10.1117/1.429994.
- 121 12. Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papot M, Mello MAR. The maximal  
122 lactate steady state is ergometer-dependent in experimental model using rats. *Rev*  
123 *Bras Med Esporte.* 2006; 12(5):259-262. Doi:10.1590/S1517-  
124 86922006000500007.
- 125 13. Aleixo, PH; Da Silva, LS; Ozaki, GAT; Garcia, AT; Zanuto, EAC; Camargo; RCT;  
126 Camargo Filho, JCS; Castoldi, RC. Effects of consumption of soft drinks on the  
127 muscular morphology of animals submitted to concurrent training. *Int. j.*  
128 *morphol*, 2019;37(2):671-676. Doi:10.4067/S0717-95022019000200671
- 129 14. Castoldi RC. Modelação das fibras musculares e efeitos na composição corporal de  
130 ratos submetidos a diferentes protocolos de treinamento físico. 2013;100 f.  
131 Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/87349>
- 132 15. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman Spectroscopy of Biological Tissues.  
133 *Appl Spectrosc Rev.* 2007;42(5):493–541. Doi:10.1080/05704920701551530.
- 134 16. Currey JD. **Bones: structure and mechanics.** Princeton University Press; 2002.  
135 436p.
- 136 17. Allori AC, Sailon AM, Pan JH, Warren SM. Biological basis of bone formation,  
137 remodeling, and repair - Part III: biomechanical forces. *Tissue Eng.*  
138 2008;14(3):285–293. Doi:10.1089/ten.teb.2008.0084
- 139 18. Cadore EL, Brentano MA, Krueel LFM. Effects of the physical activity on the bone  
140 mineral density and bone remodeling. *Rev Bras Med do Esporte.*  
141 2005;11(6):373–379. Doi:10.1590/S1517-86922005000600013.
- 142 19. Mottini DU, Cadore EL, Krueel LFM. Efeitos do exercício na densidade mineral  
143 óssea. *Motriz Rev Educ Física.* 2008;14(1):85–95. Doi:10.1590/S1517-  
144 86922005000600013
- 145 20. Menkes A, Mazel S, Redmond RA, Koffler K, Libanati CR, Gundberg CM, et al.  
146 Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in  
147 middle-aged and older men. *J Appl Physiol.* 1993;74(5):2478–2484. Doi:  
148 10.1152/jappl.1993.74.5.2478.
- 149 21. Humphries B, Newton RU, Bronks R, Marshall S, McBride J, Triplett-McBride T,  
150 et al. Effect of exercise intensity on bone density, strength, and calcium turnover in

- 151 older women. **Med Sci Sports Exerc.** 2000;32(6):1043–50. Doi:10.1097/00005768-  
152 200006000-00002
- 153 22. Davicco M, Horcajada-Molteni M, Gaumet-Meunier N, Lebecque P, Coxam V,  
154 Barlet J. Endurance training and bone metabolism in middle-aged rats. **Mech**  
155 **Ageing Dev.** 1999;109(2):83–96. Doi: doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00026-3
- 156 23. Pruitt LA, Jackson RD, Bartels RL, Lehnhard HJ. Weight-training effects on bone  
157 mineral density in early postmenopausal women. **J Bone Miner Res.**  
158 2009;7(2):179–85. Doi:10.1002/jbmr.5650070209
- 159 24. Ryan AS, Treuth MS, Rubin MA, Miller JP, Nicklas BJ, Landis DM, et al. Effects  
160 of strength training on bone mineral density: hormonal and bone turnover  
161 relationships. **J Appl Physiol.** 1994 Oct [cited 2017 May 28];77(4):1678–84.  
162 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836186>
- 163 25. Vincent KR, Braith RW. Resistance exercise and bone turnover in elderly men and  
164 women. **Med Sci Sport Exerc.** 2002;34(1):17–23. Doi:10.1097/00005768-  
165 200201000-00004.
- 166 26. Maïmoun L, Lumbroso S, Manetta J, Paris F, Leroux JL, Sultan C. Testosterone is  
167 significantly reduced in endurance athletes without impact on bone mineral density.  
168 **Horm Res.** 2003;59(6):285–92. Doi:10.1159/000070627.
- 169 27. Gomes RJ, Caetano FH, Hermine HA, Rogatto GP, Eliete L. Efeitos do treinamento  
170 físico sobre o hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à  
171 insulina (IGF-1) em ratos diabéticos. **R bras Ci e Mov.** 2003;11(3):57–62.  
172 Disponível  
173 em:<https://portalrevistas.ucb.br/index.php/RBCM/article/download/511/536>
- 174 28. Kjær M, Magnusson P, Langberg H (2006) Extracellular matrix adaptation of  
175 tendon and skeletal muscle to exercise tendon and collagen synthesis. **J Anat.**  
176 2006;208(4):445-450. Doi:10.1111/j.1469- 7580.2006.00549.x
- 177 29. Mandair GS, Morris MD. Contributions of Raman spectroscopy to the  
178 understanding of bone strength. **Bonekey Rep.** 2015;4(0):1-8.  
179 Doi:10.1038/bonekey.2014.115
- 180 30. Godfrey RJ, Madgwick Z, Whyte GP. The exercise-induced growth hormone  
181 response in athletes. **Sport Med.** 2003;33(8):599–613. Doi:10.2165/00007256-  
182 200333080-00005
- 183 31. Al Dahamsheh Z, Al Rashdan K, Al Hadid A, Jaradat RD, Al Bakheet M, Bataineh  
184 ZS. The Impact of Aerobic Exercise on Female Bone Health Indicators. **Med Arch.**  
185 2019;73(1):35-38. Doi:10.5455/medarh.2019.73.35-
- 186 32. Ribeiro SML, Tirapegui J. Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I).  
187 Algumas relações com crescimento corporal e tecidual, exercício físico e dieta. **Cad**  
188 **Nutr.** 1995;10:30-47.

