TESIS DOCTORAL EUROPEA (Ph.D)



EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO DE FUERZA SOBRE LA SENSIBILIDAD DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO A LA LEPTINA

EFFECTS OF RESISTANCE TRAINING ON LEPTIN SENSITIVITY IN HUMAN SKELETAL MUSCLE



HUGO OLMEDILLAS FERNÁNDEZ

Laboratorio de Rendimiento Humano Departamento de Educación Física

Las Palmas de Gran Canaria 2010



Departamento: EDUCACIÓN FÍSICA

Programa de Doctorado: "ACTIVIDAD FÍSICA, SALUD Y RENDIMIENTO DEPORTIVO"

<u>Título de la Tesis</u>

"EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO DE FUERZA SOBRE LA SENSIBILIDAD DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO A LA LEPTINA ."

Tesis Doctoral presentada por D. <u>Hugo Olmedillas Fernández</u>. Dirigida por el Dr. D. <u>José Antonio López Calbet</u>. Codirigida por el Dr. D. <u>Alfredo Santana Rodríguez</u>. Codirigida por el Dr. D. <u>Carlos Borja Guerra Hernández</u>. Codirigida por el Dr. D. <u>Joaquín Sanchís Moysí.</u>

El Director, Los Codirectores El Doctorando,

(firma)

(firma)

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, 2009

CONTENIDOS.

Prólogo y agradecimientos			
Lista de publicaciones originales	10		
Fuentes de financiación			
Abreviaturas	12		
Resumen general			
Summary	17		
1. Introducción	20		
1.1 Leptina	21		
1.1.1 Receptores de leptina	23		
1.1.2 Principales vías de señalización	25		
1.1.2.1 Cascada de señalización de JAK/STAT	26		
1.1.2.2 Cascada de señalización de MAPK			
1.1.2.3 Vía de señalización de IRS / PI3K			
1.1.2.4 AMPK	30		
1.1.3 Ejercicio y sensibilidad muscular a la leptina	31		
1.2 Efectos del entrenamiento de fuerza sobre la masa muscular en adultos			
1.2.1 Tipos de fibra muscular			
1.2.2 Respuesta molecular al entrenamiento de fuerza y resistencia	40		
1.2.3 Principios del entrenamiento de fuerza y su relación con la señalización muscular.			
1.2.4 Entrenamiento combinado de fuerza y resistencia	58		
2. Hipótesis	61		
3. Objetivos	62		
4. Metodología	63		
5. Resultados	71		
6. Discusión	76		
7. Conclusiones	91		
9. Bibliografía	92		
10. Apéndices-estudios I-IV	118		

Prólogo.

Quiero expresar mi más sincera gratitud a mi supervisor, el **Dr. José Antonio López Calbet**, quien en un primer momento me brindó la oportunidad de trabajar en su grupo. Gracias por tu generoso apoyo, por tu inestimable guía en éste y cada uno de los proyectos en los que he colaborado. Gracias por hacerme sentir que sólo con esfuerzo, estudio y trabajo se puede ir uno a dormir tranquilo (tranquilo sí, pero dormir ...), que el día tiene 24 horas, que los términos eficacia y eficiencia resultan indispensables en la labor científica, por darme la posibilidad de formarme junto con otros grupos de investigación y finalmente por colocarme en el camino de poder vivir profesionalmente de "esto" después de haber estado a tu lado.

Gracias a **Alfredo Santana**, porque me he sentido privilegiado al poder trabajar con un investigador tan metódico y perfeccionista, por haberse preocupado de mis inquietudes, por haber vivenciado junto a él tantas y tantas veces "me tiene hablando solo…".

Gracias a **Borja Guerra**, partícipe indispensable tanto en la elaboración de mi tesis como en su profesional y minuciosa ayuda dentro del laboratorio y fiel compañero fuera de éste. Sin duda un ejemplo para mí en dedicación investigadora.

Gracias a **Joaquín Sanchís**, que "persuadió" sutilmente a tenistas profesionales que compiten para que durante el transcurso de un torneo celebrado en Gran Canaria nos permitieran poder extraer biopsias de tres músculos diferentes y realizarles toda una batería de pruebas, que nos ha permitido disponer de datos novedosos en deportistas de excelencia (tan ansiados por cualquier investigador).

Gracias a mi camarada José Navarro, por TODO.

Gracias a la Dra. **Cecilia Dorado** porque sin su apoyo, mi incorporación al laboratorio (hace ya 6 años) no se hubiera producido. Igualmente su perseverancia y ese número interminable de reuniones y llamadas telefónicas con la Academia Canaria de Seguridad, ha resultado clave para que pudiera disponer de una muestra representativa de agentes de los municipios más grandes de la isla, para poder realizar el proyecto con el que conseguiría la beca que me ha permitido centrarme totalmente en mi trabajo.

Gracias al resto de los profesores miembros del grupo de investigación "Rendimiento Humano, Ejercicio Físico y Salud" de la ULPGC, **Javier Chavarren**, **Rafael Arteaga**, **José** Antonio Serrano, que me han liberado de responsabilidades, facilitándome un ambiente propicio para desempeñar mi trabajo en el laboratorio.

No olvido a mis compañeros de laboratorio con los que comencé, **Germán Vicente**, **Jorge Pérez**, **Nacho Ara**, quienes me dejaron acercarme a las técnicas que manejaban en el laboratorio y más importante aún saber interpretarlas. Además con los años me han demostrado, cada uno a su manera, que siguen estando cercanos.

De igual forma durante el proyecto de esta tesis, he tenido la fortuna de colaborar con mis actuales compañeros de laboratorio, muchas horas juntos, con inquietudes hacia la investigación y que me han hecho esforzarme aún más. Sin su duro trabajo, plena dedicación y alta dosis de profesionalidad esta tesis nunca hubiera alcanzado el nivel deseado; cada uno de ellos ha sido una pieza clave, por todo esto, gracias **Oscar Bernales**, gracias **Jesús Ponce**, gracias **David Morales**. Un agradecimiento especial merecen mis compañeras de trabajo, de viaje y de Congresos: **Teresa Fuentes** que me ayudado en muchas de las determinaciones proteicas que aquí aparecen<u>;</u> **Safira Delgado**, con quien compartí los duros momentos iniciales en la incorporación al laboratorio; **Amelia Guadalupe** que contribuyó decisivamente a que se pudiera llevar a cabo el plan de entrenamiento de los policías y que con que la posteriormente he desarrollado toda mi actividad investigadora, por todo esto gracias a las tres.

Un especial agradecimiento merecen los sujetos experimentales (alumnos de esta facultad, tenistas y policías locales de Gran Canaria), que se han prestado a participar en cada uno de los proyectos que aquí se presentan y que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias a la colaboración de la clínica San Roque y a los doctores **Santiago Alayon** y **Fernando Idoate** y a la labor técnica de **Alberto Carreras** con el análisis realizado para el primer trabajo de esta tesis.

He de agradecer a la **Universidad de Las Palmas de G.C.** y especialmente al **Departamento de Educación Física** las facilidades que me ha brindado para obtener la adecuada financiación para poder compartir con otros investigadores experiencias y conocimientos en mis estancias en otros centros de investigación así como en los congresos en los que hemos participado.

Gracias al personal de la Facultad, Vicky, Rosa Delia, Julio, Carmen, Leo, Maribel, Julio Martínez, Yolanda ...

5

De igual forma mi agradecimiento al grupo del **Professor Bangsbo** (en especial **Martin**, **Nikolai**, **Gemma**, **Dorte**, **Jens** y **Nikoline**) en Copenhagüe quienes me permitieron participar activamente en uno de sus proyectos, en colaboración con el Profesor **McKenna**, tomando parte activa desde su creación hasta los análisis posteriores.

A mis padres y hermanos.

Listado publicaciones originales.

La presente tesis se basa en las siguientes publicaciones:

I. Sanchis-Moysi J, Idoate F, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Alayón S, Carreras A, Dorado C, Calbet JA. The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, fiber-type distribution and muscle strength. Scand J Med Sci Sports. 2009 Jul 6.

II. Hugo Olmedillas, Joaquin Sanchis-Moysi, Teresa Fuentes, Amelia Guadalupe-Grau, Jesus G. Ponce-Gonzalez, David Morales-Alamo, Alfredo Santana, Cecilia Dorado, Jose A L Calbet and Borja Guerra. Muscle hypertrophy and increased expression of leptin receptors in the musculus triceps brachii of the dominant arm in professional tennis players. European Journal Applied Physiology (In press).

III. Hugo Olmedillas, Borja Guerra, Amelia Guadalupe-Grau, Alfredo Santana, Teresa Fuentes, Cecilia Dorado, José A Serrano-Sanchez, Jose A L Calbet. **Concurrent strength and endurance training, leptin receptors and SOCS3 protein expression in the human vastus lateralis** (Submitted).

 IV. Borja Guerra, Hugo Olmedillas, Amelia Guadalupe-Grau, Jesús G. Ponce-González, David Morales-Alamo, Teresa Fuentes, Pedro De Pablos, Alfredo Santana, José A.L. Calbet.
Sprint exercise is a leptin signalling mimetic in human skeletal muscle (Submitted).

Fuentes de financiación.

Los estudios que componen esta tesis doctoral han sido cofinanciados por el Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (BFU2006-13784, BFI2003-09638 y FEDER); Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; Gobierno de Canarias (PI2005/177); FUNCIS (PI/10/07) y Academia Canaria de Seguridad.

Hugo Olmedillas ha recibido financiación como becario de postgrado para la realización de Tesis del Gobierno de Canaria (Consejería de Educación, Cultura y Deportes. Dirección general de Universidades e Investigación).

Listado de abreviaturas.

ACC: (Acetyl coenzyme A carboxylase), acetil CoA carboxilasa.

Akt: (Protein kinase B (PKB)), proteína quinasa B (PKB).

AMP: Adenosín monofosfato.

AMPK: (AMP-activated protein kinase), proteína quinasa activada por adenosin monofosfato.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AS160: (Akt substrate of 160 kDa), substrato de AKT de 160KDa.

ATP: Adenosín trifosfato.

CG: (Control group), grupo control.

CSA: (Cross-sectional area), área de sección transversal del músculo.

DHT: Dihidrotestosterona.

DTB: (Dominant triceps braquialis), triceps braquial dominante.

DXA: (Dual energy X-ray absorptiometry), absorciometría fotónica dual de rayos X.

ELISA: (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), técnica para la medición de la concentración sérica de hormonas.

EMG: Actividad electromiográfica.

ERK: (Extracellular Regulated Kinases), quinasas de regulación extracelular.

FIM: Fuerza isométrica máxima.

FT: (Free testosterone), testosterona libre.

GG: (Glucose Group), grupo glucosa.

GH: (Growth hormone), hormona del crecimiento.

HOMA: (Homeostasis Model Assessment), modelo de valoración homeostático.

HS: (Half squat), media sentadilla.

IGF-1: (Insulin-like growth factor 1), factor de crecimiento insulínico tipo 1.

IL: Interleucina o interleuquina.

ILP: (Inclined leg press), prensa inclinada.

IMC: Indice de masa corporal.

IRS: (Insulin receptor substrates), receptor de insulina.

JAK: (Janus kinase), proteína quinasa Janus.

KDa: Kilodalton.

Kcal: Kilocalorias.

LC: (Leg curl), flexiones de piernas.

LE: (Leg extension), extensión de piernas.

MAPK: (Mitogen-activated protein kinases), proteína quinasa activada por mitógenos.

MyHC: (Myosin heavy chain), cadena pesada de miosina.

MME: Masa muscular de las extremidades.

MMA: Masa muscular de los brazos.

MRF: Factores de regulación miogénicos.

NDTB: (Non dominant triceps braquialis), triceps braquial no dominante.

NPY: Neuropeptido Y.

mTOR: (Mammalian target of rapamycin), proteína quinasa de mamíferos diana de la rapamicina.

ob/ob: Ratones KO para el gen de la leptina.

OB-Rs (OB-Ra,OB-Rb,OB-Rc,OB-Rd,OB-Rf): (Obesity receptors), receptores transmembrana para la leptina.

OB-Re: (Leptin binding protein), proteina de unión a la leptina en sangre.

PI-3K: (*Phosphatidylinositol-3*), proteína quinasa de fosfatidilinositol-3.

PTP1B: (Protein tyrosine phosphatase 1b), proteina tirosina fosfatasa 1B.

p70 S6K: (Ribosomal protein S6 kinase beta-1), proteína ribosómica de 70 kDa.

R: (Rest), reposo.

RE: (Resistance training), entrenamiento de fuerza.

SDS-PAGE:(Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis), electroforesis desnaturalizante en geles de acrilamida con SDS.

SNC: Sistema nervioso central.

SOCS: (Supressor of cytokine signalling), proteína supresora de la señalización por citocinas.

STAT(STAT1,2,3): (Signal transducer and activator of transcription), transductores de señales y activadores de la transcripción.

TF: Test de fuerza.

TGF-6: (Transforming growth factor), factor de crecimiento transformante beta.

Thr: (Threonin), treonina.

Tyr: (Tyrosine), tirosina.

VL: (Vastus lateralis), vasto lateral.

1RM: Fuerza dinámica máxima.

4E-BP1: (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1), proteína de unión 1 del factor eucoariótico de iniciación de la traducción 4E.

Resumen general.

La obesidad constituye el principal problema de salud comunitaria al que deberá enfrentarse la sociedad occidental y especialmente la sociedad canaria en los próximos años. El tratamiento de la obesidad se basa en instaurar un balance energético negativo a través de disminuir la ingestión de calorías y/o aumentar el gasto calórico debido a la actividad física. Los fármacos que actúan atenuando el apetito y aumentando el metabolismo, como la leptina, podrían ser de gran ayuda. Sin embargo, los obesos desarrollan resistencia a la leptina, que podría estar en parte relacionada con la resistencia a la insulina. Estudios efectuados con roedores han demostrado que el ejercicio aumenta la sensibilidad a la leptina. La combinación de entrenamiento de fuerza y de resistencia podría ser muy eficaz para producir una disminución de la grasa corporal, aumentar el gasto energético diario y aumentar la sensibilidad a la leptina.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar si el ejercicio físico, basado en la combinación de entrenamiento de fuerza y de resistencia en humanos altera la sensibilidad a la leptina en músculo esquelético humano, así como determinar si las vías de señalización de la leptina son activadas por el ejercicio en el músculo esquelético humano. Para ello decidimos examinar en primer lugar cuál es el grado de hipertrofia que presentan los músculos del brazo dominante de 15 tenistas profesionales usando absorpciometría fotónica dual de rayos X, resonancia nuclear magnética y biopsias musculares. Esto nos permitió constatar que el tríceps braquial de los tenistas profesionales tiene un volumen muscular un 15% superior al del brazo no dominante y que las fibras musculares de tríceps braquial dominante tienen un área de sección transversal un 22% mayor que las fibras del tríceps contralateral. Así mismo, constatamos que el tríceps dominante y el contralateral presentan aproximadamente 2/3 de fibras tipo 2 y 1/3 de fibras tipo 1. En este mismo músculo se determinó si la hipertrofia crónica produce un aumento en la expresión proteica de la isoforma larga del receptor de leptina (OB-R170). En este segundo estudio se determinó también el contenido proteico de perilipina A, proteína supresora de la señalización por citoquinas (SOCS3), proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) y la fosforilación del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) por western blot. La expresión proteica de SOCS3 y PTP1B fue similar en ambos brazos, mientras que la fosforilación de STAT3 se redujo en el brazo no dominante. Además, el contenido proteico de OB-R170 en el brazo dominante resultó mayor que el encontrado en el vasto lateral del cuádriceps. Posteriormente, para verificar si la hipertrofia muscular produce un aumento en la expresión proteica del receptor OB-R ó una disminución de la expresión proteica de SOCS3, aplicamos un programa de entrenamiento de fuerza combinado con ejercicios de resistencia (carrera contínua) durante 12 semanas a 9 policías sanos, mientras que otros 8 policías integraron el grupo control. El grupo de entrenamiento incrementó de manera significativa la fuerza dinámica máxima en los ejercicios de los miembros inferiores y superiores (18-54%) y redujo la masa grasa en 1.8 kg así como la concentración de leptina por kg de masa grasa. Además, el entrenamiento produjo hipertrofia muscular en las fibras tipo 2 (+18.5%) pero no en las fibras musculares tipo 1. No se observaron cambios ni en la expresión proteica de OB-R ni en SOCS3 con el entrenamiento. Finalmente, guisimos analizar con un modelo de ejercicio "all out" (un esfuerzo máximo de sprint) de 30 segundos en cicloergómetro (test de Wingate) si el ejercicio físico es capaz de inducir la activación de las vías de señalización de leptina, es decir, de las vías de señalización que se presuponen activadas en músculo esquelético cuando aumenta la leptina circulante. En este último estudio participaron 15 estudiantes de educación física a los que se les realizó una biopsia muscular en el vasto lateral y se dividió aleatoriamente entre el grupo glucosa (G;n=8), el cual ingirió 75g de glucosa 1 hora previa a la realización del test de Wingate y el grupo control (C;n=7) que realizó el ejercicio en ayunas. Treinta minutos después del ejercicio de sprint los niveles de fosforilación de STAT3 y ERK aumentaron. La expresión proteica de SOCS3 aumentó en los 120 minutos posteriores al ejercicio; sin embargo, la expresión proteica de PTP1B no se vio afectada. La ingestión de glucosa atenuó la fosforilación de STAT3 y ERK y el incremento a los 120 minutos de la expresión proteica de SOCS3. La activación de estas cascadas de señalización ocurrió a pesar de la disminución en la concentración de leptina después del sprint. Los niveles basales en la fosforilación de JAK2 y p38 MAPK se redujeron e incrementaron, respectivamente, por la glucosa ingerida, antes del ejercicio. Sin embargo los niveles de fosforilación de JAK2 y p38 MAPK aumentaron y disminuyeron, respectivamente, durante el periodo de recuperación, cuando el ejercicio es precedido por la ingestión de glucosa. Estos resultados indican que el ejercicio facilita la fosforilación de JAK2 cuando el nivel de éste se ve disminuido antes de la realización del ejercicio. Nuestros resultados también señalan que el efecto del ejercicio en la fosforilación de p38 MAPK depende del nivel basal de éste antes del comienzo del ejercicio.

En definitiva, esta tesis demuestra que los receptores musculares de leptina aumentan con la sobrecarga muscular crónica, pero no tras un programa de entrenamiento de sólo 12 semanas de duración. Además hemos demostrado que el ejercicio de sprint es capaz de

15

activar las mismas vías de señalización que la leptina en el músculo esquelético humano, es decir el ejercicio de sprint es un mimético de la leptina en el músculo esquelético humano.

Summary.

Obesity is the main health challenge that the occidental society and specially the Canarian society will have to face in the years to come. Although the treatment of obesity is based on the achievement of a negative energy balance some drugs with effect on appetite and basal metabolism, such as leptin could facilitate this process. However, obesity is associated to leptin resistance, which in turn, may be related to the concomitant insulin resistance. Studies in rodents have shown that exercise enhances leptin sensitivity in skeletal muscles. Thus, regular exercise and, particularly concurrent strength and endurance training, could be very effective to both reduce the fat mass, increase daily energy expenditure and improve leptin sensitivity.

The main objective of this thesis was to determine if, in humans, physical exercise based on concurrent resistance and endurance training modifies the sensitivity to the leptin in human skeletal muscle, and to determine if the leptin signaling pathways are also activated by exercise in human skeletal muscle. We started by determining what is the level of hypertrophy present in the dominant muscles of 15 professional tennis players using dual energy x-ray absorptiometry, magnetic resonance imaging, and muscle biopsies. The outcome was that, in the professional tennis players, the musculus triceps braquialis has a muscular volume 15% larger in the dominant compared to the non dominant arm, due to hypertrophy of the individual muscle fibers, which has a 22% greater cross-sectional area (CSA). We also observed that both arms have a similar fiber type distribution, despite the marked differences in use and CSA, with 2/3 of type 2 and 1/3 type 1 fibers. We also found that the protein expression of the long isoform of the leptin receptor (OB-R170) is increased in the dominant arm triceps brachii. In this second study, we assessed also the protein content of Perilipine A, suppressor of the cytokine signaling 3 (SOCS3), and tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), as well as the phosphorylation of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) by western blot. The protein expression of SOCS3 and PTP1B was similar in both arms; while the phosphorylation of STAT3 was reduced in the dominant arm. Furthermore, the protein content of OB-R170 in the dominant arm was higher than in the vastus lateralis. In the next study, to determine if the muscular hypertrophy produces an increase in the protein expression of the OB-R or a decrease in the protein expression of SOCS3, we studied the effects of a concurrent resistance and endurance training (running) for 12 weeks in 9 healthy policemen; while another 8 policemen were included in the control group. The training group increased significantly the maximal dynamic strength in lower and upper body exercises (18-54%) and reduced their body fat mass by 1.8 kg and their serum leptin concentration per kg of fat mass. Likewise, the training elicited muscle hypertrophy of type 2 (+18.5%) but not of the type 1 muscle fibers. Not significant changes were observed in either OB-R or SOCS3 after training. Finally, to determine if exercise may act as a leptin mimetic we obtained muscle biopsies in 15 physical students randomly distributed into a glucose group (G;n=8), who ingested 75g of glucose one hour before a Wingate test (a 30 seconds sprint test) and a fasting control group (C;n=7), who performed the sprint under fasting conditions. Thirty minutes after the control sprint the phosphorylation level of STAT3 and ERK was increased. The protein expression of SOCS3 increased only after 120 minutes after the control sprint but PTP1B was unaffected. Glucose ingestion abolished the 30 min phosphorilation of the STAT3 and ERK and the 120 minutes increased SOCS3 protein expression. The basal phosphorylation levels of JAK2 and p38MAPK were reduced and increased respectively, by glucose ingestion prior to exercise. However the basal phosphorylation levels were elevated and reduced, respectively, during the recovery when the exercise was preceded by glucose ingestion. These findings indicate that exercise facilitates JAK2 phosphorylation when the level of JAK2 phosphorylation is reduced prior to the start of exercise. Our results also imply that the effect of exercise on p38MAPK phosphorylation depends on the level of p38MAPK phosphorylation prior to the start of the exercise.

In conclusion, this thesis shows that there is an up-regulation of the leptin receptors with the chronic exercise, but not after a training program only 12 weeks long. In addition, we have shown that sprint exercise is able to activate the same signaling pathways usually stimulated by leptin in skeletal muscle, i.e., sprint exercise act as a leptin mimetic.

1. Introducción.

El sobrepeso y la obesidad afectan a más del 66% de la población adulta en Estados Unidos y se asocian con una gran variedad de enfermedades crónicas (Ogden et al. 2006). De hecho, la reducción de la incidencia de la obesidad es el principal propósito del programa Healthy People 2010 del Gobierno de los Estados Unidos de America (Services. 2000). Nuestro país presenta índices de los más elevados de Europa y en especial la sociedad canaria presenta una tasa de prevalencia de obesidad y sobrepeso que está entre las más altas de España (Aranceta et al. 2003; Gutierrez-Fisac et al. 2005; Rodriguez Artalejo et al. 2002). Este problema afecta a todos los segmentos de la población, desde niños a adultos y ancianos (Aranceta et al. 2001; Aranceta et al. 2003; Gutierrez-Fisac et al. 2004; Serra Majem et al. 2003). En la mayoría de los casos la obesidad se asocia a una falta de actividad física y a un desequilibrio entre la energía consumida y la energía gastada (Ara Royo 2003b). Por lo tanto, un tratamiento efectivo de la obesidad se basa en instaurar un balance energético negativo a través de disminuir la ingestión de calorías y/o aumentar el gasto calórico debido a la actividad física.

Para establecer un balance energético negativo es necesario combinar la reducción de la ingesta calórica con un aumento de la actividad física (Ara et al. 2004; Bar-Or et al. 1998; Blair and Church 2004; Lobstein et al. 2004; Ribeiro et al. 2005). Además de facilitar el establecimiento de un balance energético negativo y, por tanto la pérdida de grasa corporal, la práctica de actividad física se asocia, independientemente del grado de adiposidad, a una menor mortalidad en la población general (Hu et al. 2004) y a un menor riesgo cardiovascular (Blair and Jackson 2001; Borodulin et al. 2005). En este sentido, la última recomendación del Colegio Americano de Medicina del Deporte (ACSM) es la realización de al menos 150 minutos de actividad física moderada para prevenir el aumento de peso, y proponen un volumen de actividad física de unos 250 a 300 minutos/semana con el objetivo de pérdida de peso (Donnelly et al. 2009).

1.1 Leptina.

En los años 70, a través de experimentos parabióticos en los que se conectó indirectamente los sistemas circulatorios de dos ratones adultos, uno del tipo *ob/ob* y uno salvaje, se observó que el ratón obeso perdía peso de forma significativa. Esto sugirió la existencia de una sustancia en la sangre del ratón normal (o salvaje), reguladora de la masa grasa cororal (Coleman and Hummel 1973). Esta sustancia en concreto resultó ser una hormona a la que se denominó leptina, que etimológicamente procede de la palabra griega "leptos", que significa "delgado" (Zhang et al. 1994), y es producida por el gen *ob*. Se trata de una hormona de 16 KDa producida por los adipocitos, en proporción directa a la masa grasa, que actúa disminuyendo el apetito y aumentando el metabolismo basal a través de su acción en el sistema nervioso central (SNC) (Dulloo et al. 2002; Friedman and Halaas 1998; Muoio et al. 1999b; Muoio et al. 1999a; Wauters et al. 2002). De hecho, este descubrimiento supuso un paso muy importante en el conocimiento de los efectos mediados por los diferentes factores producidos por el tejido adiposo sobre la homeostasis energética.

Los niveles circulantes de leptina correlacionan directamente con el IMC (Índice de Masa Corporal) y con la cantidad total de masa grasa (Ara Royo 2003a; Banks 2004; Fruhbeck 2001; Fruhbeck et al. 1998). En general, un aumento de la masa grasa total se asocia a un aumento de los niveles circulantes de leptina (Considine 1997; Friedman and Halaas 1998); por el contrario, la reducción de las reservas de grasa corporal por la práctica regular de actividad física o por la dieta provoca un descenso de las concentraciones plasmáticas de la hormona (Ara Royo 2003b; Houmard et al. 2000; Perusse et al. 1997). Aunque la leptina es mayoritariamente producida y secretada al torrente sanguíneo por los adipocitos, esta no es la única fuente potencial de la hormona. Se ha observado que existen otros tejidos que son capaces de producir pequeñas cantidades de leptina en determinadas circunstancias, entre ellos cabe destacar la placenta, la mucosa gástrica, la médula ósea, el epitelio de la glándula mamaria, el músculo esquelético, la pituitaria, el hipotálamo y el hueso (Ahima and Osei 2004; Bado et al. 1998; Masuzaki et al. 1997; Morash et al. 1999; Tena-Sempere et al. 2001). Inicialmente, se pensó que los efectos de la leptina se producían únicamente a nivel central, sin embargo, actualmente se sabe que la leptina es una hormona pleiotrópica que ejerce funciones fisiológicas tanto en el SNC como en múltiples tejidos periféricos (Akerman et al. 2002; Baratta 2002; Bjorbaek and Kahn 2004; Fruhbeck 2001; Harvey and Ashford 2003) (Figura 1). Entre los diferentes tejidos periféricos diana de la acción de la leptina se encuentra el músculo esquelético, principal tejido regulador del metabolismo basal y uno de los principales moduladores del metabolismo de los ácidos grasos y de la glucosa (Steinberg and Dyck 2000). En este tejido la hormona actúa incrementando la oxidación de los ácidos grasos, reduciendo la acumulación de grasa intramuscular y aumentando la captación de glucosa y el consumo energético (Argiles et al. 2005; Berti and Gammeltoft 1999; Ceddia et al. 2001; Muoio and Lynis Dohm 2002; Steinberg et al. 2002; Yaspelkis et al. 2001).





La práctica regular de ejercicio físico se asocia a un descenso de la masa grasa corporal, especialmente de la masa grasa visceral, aumento de la sensibilidad a la insulina, disminución de los niveles basales de glucosa e insulina y aumento de la expresión de proteínas transportadoras de glucosa y ácidos grasos en las fibras musculares (Dumortier et al. 2003; Rimbert et al. 2004; Roepstorff et al. 2004). En los últimos años se han aportado evidencias experimentales que demuestran que el ejercicio físico es capaz de incrementar la

sensibilidad muscular a la leptina. Así, se ha observado que el entrenamiento físico regular es capaz de prevenir, al menos parcialmente, la resistencia muscular a la leptina observada en roedores alimentados con dietas ricas en grasa (Steinberg et al. 2004b). Los datos en humanos son mucho menos abundantes puesto que sólo existen algunos estudios que demuestran que el ejercicio físico reduce los niveles circulantes de leptina sin producir alteraciones de la masa grasa corporal, lo que sugiere, indirectamente, un incremento de la sensibilidad a la hormona (Ara et al. 2006; Pasman et al. 1998; Perusse et al. 1997). Hasta la actualidad no existen estudios efectuados en seres humanos sobre la potencial modulación que podría inducir el ejercicio físico sobre la cascada de señalización activada por leptina en músculo esquelético.

1.1.1 Receptores de leptina.

La naturaleza pleiotrópica de las acciones de la leptina se debe a la distribución universal de su receptor. La hormona ejerce sus acciones tanto a nivel central como periférico (Considine et al. 1996; Friedman and Halaas 1998; Guerra et al. 2007; Yaspelkis et al. 2001) interaccionando con receptores transmembrana (OB-Rs) que poseen una estructura muy similar a los pertenecientes a la familia de receptores de citoquinas de la clase 1 (Tartaglia 1997; White and Tartaglia 1996). Existen al menos seis isoformas de OB-Rs, designadas como OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, OB-Re, y OB-Rf, y generadas por procesamiento alternativo de un único Ácido Ribonucleico Mensajero ARNm y/o por procesamiento proteolítico de los productos proteicos subsecuentes. Todas estas isoformas poseen en común un dominio extracelular de unos 800 aminoácidos, un dominio transmembrana de 34 aminoácidos y difieren en el dominio intracelular que es característico de cada isoforma (Chua et al. 1997; Lee et al. 1996; Tartaglia 1997). Por tanto, estas isoformas pueden ser clasificadas dentro de tres clases: corta, larga y secretada o soluble (Figura 2).



Figura 2. Representación esquemática de los diferentes dominios de las isoformas larga (OB-Rb), corta (OB-Ra) y secretada (OB-Re) del receptor de leptina. Únicamente OB-Rb posee una cola citoplasmática, altamente conservada en múltiples especies, que contiene los motivos Box 1 (B1) y Box 2 (B2), necesarios para la interacción, y máxima activación, de determinadas guinasas intracelulares. Modificado de Tartaglia y col. (Tartaglia 1997).

A pesar de que las isoformas cortas del receptor (OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd y OB-Rf) poseen una pequeña cola citoplasmática de 30-40 aminoácidos, sólo la isoforma larga (OB-Rb) fue inicialmente considerada como la forma funcional del receptor ya que es la única que posee una cola citoplasmática de unos 300 aminoácidos, altamente conservada en numerosas especies, que contiene una serie de motivos imprescindibles para la interacción con otras proteínas y para la posterior activación de determinadas vías de señalización (Chua et al. 1997; Tartaglia 1997; Tartaglia et al. 1995).

Se ha observado que la ausencia de OB-Rb es la responsable del fenotipo obeso del ratón *db/db* y de la rata *fa/fa* (Chua et al. 1996). Otros estudios han demostrado que la eliminación selectiva de todas las isoformas de OB-R en neuronas produce obesidad en

ratones, lo que evidencia la importancia de la acción neuronal de la leptina en lo que se refiere a la modulación del peso corporal (Cohen et al. 2001). La isoforma larga del receptor (OB-Rb) se expresa mayoritariamente en el hipotálamo (Burguera et al. 2000), aunque recientemente se ha demostrado su presencia proteica en músculo esquelético humano (Guerra et al. 2007), siendo la abundancia de receptores OB-Rb mayor en mujeres que en hombres (Guerra et al. 2008). Las isoformas cortas también se expresan en determinadas regiones del SNC como son los plexos coroideos, aunque su expresión es mayoritaria en tejidos periféricos como el adiposo (Bjorbaek and Kahn 2004; Guerra et al. 2007). Las funciones de las isoformas cortas no están completamente aclaradas, si bien podría intervenir en la recaptación de la leptina desde el fluido cerebroespinal así como el transporte mediado por el receptor de la hormona a través de la barrera hematoencefálica (Bjorbaek and Kahn 2004; Hileman et al. 2002). Por otro lado, se ha demostrado que la isoforma secretada o soluble (OB-Re), la cual carece del dominio intracelular, es la principal proteína unida a la leptina (Leptin Binding Protein) en la sangre humana (Lammert et al. 2001). Los niveles circulantes de OB-Re dependen del sexo, del grado de adiposidad y de la concentración de leptina (Chan et al. 2002). Inicialmente, la investigación de las diferentes acciones de la leptina sobre la homeostasis energética y el control del peso corporal, se centró únicamente en el SNC. Sin embargo en la actualidad, y debido fundamentalmente a la amplia distribución de las isoformas cortas y largas de OB-R en numerosos tejidos extra-neurales, se está prestando un interés cada vez mayor a los efectos de esta hormona en la periferia.

1.1.2 Principales vías de señalización.

En los últimos años, la investigación sobre los múltiples efectos de la leptina se ha centrado en el estudio de las diferentes vías de señalización activadas tras su unión al receptor; esto ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares que gobiernan las diferentes acciones de la hormona. Inicialmente, la aceptación de la similitud estructural del OB-R con determinados miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas resultó en la pronta identificación de la vía de señalización de JAK/STAT (*Janus Kinase / Signal Transducer an Activator of Transcription*) como una de las principales cascadas de señalización activadas por la leptina (Ahima and Osei 2004; Ghilardi and Skoda 1997; Hegyi et al. 2004; Ihle and Kerr 1995; Sahu 2003; Sweeney 2002). Estudios posteriores han mostrado que sólo OB-Rb contiene una serie de motivos en su cola citoplasmática que son necesarios para la correcta activación de la vía de JAK/STAT (Bahrenberg et al. 2002; Kloek et al. 2002).



Figura 3. Mecanismos de regulación negativa de la señalización activada por leptina a través de la isoforma larga de su receptor (OB-Rb). Cuando los niveles de leptina están permanentemente elevados se produce sobreactivación de STAT3 (Signal transducer an activator of transcription 3), lo que a su vez induce la expresión del gen SOCS3 (Suppresor of Cytokine Signalling 3). El producto proteico de SOCS3 interacciona con Y985 de OB-Rb y con JAK2, bloqueando la señalización activada por la hormona. Otro regulador negativo de la señalización activada por leptina es la proteína PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B), la cual es capaz de interaccionar con JAK2 bloqueando su señalización. Modificado de Myers y col.(2004).

1.1.2.1 Cascada de señalización de JAK/STAT.

Los receptores funcionales de citoquinas, entre los que se incluye OB-R, poseen en su cola intracelular, en yuxtaposición con la membrana plasmática, un motivo rico en el aminoácido prolina que se denomina *Box 1* y que es esencial para la interacción y activación de JAK (Ihle and Kerr 1995). Existen además otras secuencias menos conservadas, denominadas *Box 2*,

que también juegan un importante papel en la interacción con JAK y en la discriminación de las diferentes isoformas de OB-R. El receptor de leptina carece de dominio tirosina quinasa por lo que interacciona con quinasas citoplasmáticas, principalmente con *Janus Kinase 2* (JAK2) (Ghilardi et al. 1996; Tartaglia et al. 1995; White and Tartaglia 1996). En lo que se refiere a la señalización activada por la leptina, se ha demostrado que sólo *Box 1* y los aminoácidos que están inmediatamente próximos, son esenciales para la activación de JAK (Bahrenberg et al. 2002; Kloek et al. 2002). El dominio citoplasmático de todas las isoformas de OB-R posee el motivo Box 1 para la interacción con JAK en la proximidad de la cara intracelular de la membrana; sin embargo sólo OB-Rb presenta además el motivo *Box 2* y sitios para la interacción con STAT (Kellerer et al. 1997). Aunque inicialmente se pensó que sólo la isoforma larga era capaz de señalizar, hoy sabemos que en algunas condiciones, la isoforma corta del receptor de leptina (OB-Ra) posee capacidad de activar determinadas vías de señalización mediadas a través de JAK2, sin necesidad de la presencia de estos motivos en su cola citoplasmática intracelular (Bjorbaek et al. 1997; Uotani et al. 2006).

Puesto que OB-Rb carece de actividad enzimática intrínseca, la señalización a partir del mismo se produce, tras la unión a la hormona, por su interacción no covalente con JAK2, la cual se activa como consecuencia de esta interacción y fosforila a numerosos residuos de tirosina en otras proteínas, al mismo tiempo que fosforila también determinados residuos de tirosina (985 y 1138) existentes en la cola intracelular del OB-Rb funcional (Banks et al. 2000; Bjorbaek et al. 1997; Li and Friedman 1999). Las regiones intracelulares fosforiladas de OB-Rb, fundamentalmente la tirosina 1138 (Y1138), proporcionan sitios de unión para las proteínas STAT. Diversos estudios realizados "in vitro" han demostrado que la leptina es capaz de activar diversas isoformas de STAT, como son, STAT1, 3 y 5, sin embargo otros trabajos realizados "in vivo" han demostrado que la administración intravenosa de la hormona sólo es capaz de activar a STAT3 en hipotálamo de ratón (Ghilardi et al. 1996; Vaisse et al. 1996). La interacción de STAT3 con la Y1138 de OB-Rb produce su activación, lo que a su vez provoca que se disocie del receptor y que formen dímeros en el citoplasma para finalmente translocarse al núcleo y regular la transcripción de genes relacionados con los efectos metabólicos de la leptina (Bjorbaek et al. 2001; Bjorbaek and Kahn 2004) (Figura 3). La activación de STAT3 es probablemente un componente crucial en los efectos de regulación del peso corporal por la leptina ya que se ha observado que la eliminación del residuo Y1138 de OB-Rb en ratones (ratones Knockout para la Y1138 de OB-Rb) produce obesidad severa en estos animales (Bates and Myers 2003). Las evidencias experimentales publicadas hasta ahora parecen demostrar que la señalización a través de STAT3 modulada por leptina es exclusiva de la isoforma larga del receptor puesto que OB-Ra carece del residuo Y1138 al que se une STAT3 (Uotani et al. 2006). De hecho, se ha demostrado la co-localización en el núcleo arcuato del hipotálamo de OB-Rb y no de OB-Ra, con STAT3 y neuropéptidos mediadores de la acción de la leptina como NPY (Neuropéptido Y) y POMC (Propiomelanocortina) (Ahima and Flier 2000; Hakansson and Meister 1998). Más recientemente, se ha observado que niveles reducidos de fosforilación de STAT3 (Tyr705) en presencia de concentraciones elevadas de leptina es indicativo de resistencia a la acción de la hormona (Hosoi et al. 2008). Este hecho concuerda con la idea de que la leptina modula la transcripción de estos genes implicados en la regulación de JAK-STAT (revisado en (Ahima and Flier 2000).

Por lo que respecta a la activación de la vía de JAK/STAT en tejidos periféricos, las evidencias experimentales aportadas hasta la fecha son contradictorias. Estudios realizados en roedores a los que se les administró leptina recombinante y se midió la fosforilación de STAT3 en tejidos periféricos sensibles a insulina, como el tejido adiposo blanco, músculo esquelético e hígado, no han sido capaces de demostrar que la exposición corta (3 minutos) a la hormona induzca un incremento significativo de la activación de STAT3 (Kim et al. 2000). Sin embargo, otro estudio posterior demostró que la leptina es capaz de activar rápidamente la fosforilación de STAT3 en músculo esquelético de ratón (Maroni et al. 2003).

1.1.2.2 Cascada de señalización de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases).

Las proteínas ERK (*Extracellular Regulated Kinases*) son componentes de la cascada de señalización Ras/Raf/MAPK y son activadas por numerosos estímulos, incluyendo la leptina. La vía de MAPK puede ser activada tanto por OB-Ra como OB-Rb, aunque en menor medida por el primero (Banks et al. 2000; Bjorbaek et al. 1997). Aunque la parte más distal de OB-R no es necesaria para la señalización por MAPK, sí que se ha demostrado que se requiere la porción intracelular intacta de la isoforma larga para obtener la máxima activación de la vía. Este fenómeno, se debe a que la leptina es capaz de inducir la activación de ERK a través de dos vías diferentes. Una vía modulada indirectamente por OB-R, en la cual JAK2 una vez activa fosforila a ERK y otra mediada directamente por el receptor en la cual se produce la interacción de la fosfatasa de tirosina SHP-2 con la Y985 (previamente fosforilada por JAK2)

del OB-Rb, produciéndose en última instancia la activación de ERK a través de Grb-2 (*Growth Factor Receptor Binding-2*) (Bjorbaek et al. 1997; Hegyi et al. 2004) (Figura 3). ERK, una vez activada por cualquiera de las dos vías, es capaz de translocarse al núcleo desde el citoplasma para modular positivamente la expresión de determinados genes diana de la acción de la leptina, como son *c-fos* y *egr-1*, los cuales participan en proliferación celular y diferenciación (Fruhbeck 2006). En cualquier caso, ambas vías requieren un dominio catalítico intacto de SHP-2, puesto que se ha demostrado que la pérdida de la actividad de la fosfatasa bloquea la fosforilación de ERK inducida por la leptina (Bjorbaek et al. 2001).

Existen numerosos estudios que han demostrado que la leptina es capaz de activar la cascada de MAPK "*in vivo*" e "*in vitro*", tanto en el SNC como en tejidos periféricos implicados en la regulación de la homeostasis energética y del metabolismo basal, como son el tejido adiposo y el músculo esquelético. Un estudio reciente muestra que la hormona estimula la actividad de la sintasa de óxido nítrico (*NOS*) en tejido adiposo blanco a través de un complejo mecanismo que implica a PKA (Protein Kinase A) y a ERK1/2 (Mehebik et al. 2005). Otro estudio particularmente interesante, demuestra que cuando los mioblastos murinos C2C12 son tratados con leptina se produce un rápido incremento de la fosforilación tanto de ERK como de p38 MAPK (Maroni et al. 2005).

1.1.2.3 Vía de señalización de IRS / PI3K (sustrato del receptor de insulina / fosfoinositol-3-quinasa).

PI3K representa una diana clave en las acciones de un amplio espectro de ligandos, siendo la insulina uno de los principales. De hecho, gran parte de los efectos dependientes de insulina llevan consigo la activación de PI3K. Una vez activa, PI3K es capaz de estimular la actividad de Akt (*Protein Kinase B*) y de varias isoformas de PKC (*Protein Kinase C*) (Sweeney 2002). La unión de la insulina a su receptor (IR) produce el reclutamiento de varios IRSs (*Insulin Receptor Substrates*) que posteriormente son fosforilados en residuos de tirosina por la actividad quinasa intrínseca del receptor. Como consecuencia de su fosforilación, los IRSs incrementan su afinidad de unión a otras moléculas de señalización, disparando la subsiguiente activación de PI3K y de Akt (revisado en (Fruhbeck 2006)). En lo que se refiere a la leptina, actualmente sabemos que la hormona es capaz de actuar sobre algunos componentes de la cascada de señalización por insulina, como por ejemplo IRS y PI3K, a través de OB-R. El mecanismo por medio del cual la leptina activa a PI3K ocurre a través de

JAK2, la cual una vez activa es capaz de fosforilar a IRS, permitiendo en última instancia la activación de PI3K (Kellerer et al. 1997).

La interacción de las vías de señalización activadas por IR y OB-Rb se investigó inicialmente en tejidos no neuronales. Kellerer y col. (Kellerer et al. 1997), demostraron cómo la leptina imita los efectos de la insulina en el transporte de glucosa y en la síntesis de glucógeno a través de la vía de señalización de PI3K en los miotúbulos C2C12. Los autores de este estudio comprobaron que la activación de PI3K por la leptina se produce a través del sustrato IRS-2, mientras que la activación de PI3K por parte de la insulina se produce a través de ambos sustratos, IRS1 e IRS-2. Estudios posteriores examinaron la posible regulación de PI3K por leptina en el hipotálamo, observando que se producía una rápida activación de la enzima, alcanzando los niveles máximos de activación dentro de los primeros 30 minutos (Bjorbaek and Kahn 2004). Otro estudio ha demostrado que OB-R e IR se expresan en células neuronales y responden a leptina e insulina con la estimulación de la actividad de PI3K aunque a través de diferentes mecanismos (Benomar et al. 2005). Los datos aportados por Benomar y col. (2005) indican que la leptina activa PI3K a través de IRS-2 y la insulina a través de IRS-1. En cuanto a la potencial función de la activación de la fosforilación de PI3K inducida por leptina, parece que podría ser muy importante para la regulación del apetito modulado por la hormona, puesto que existen estudios realizados en roedores que han demostrado que la administración intracerebroventricular de inhibidores de PI3K bloquea los efectos moduladores del apetito ejercidos por la leptina (Niswender et al. 2001; Rahmouni et al. 2003). Por otro lado, se cree además que esta activación de PI3K puede jugar un papel clave en la modulación inducida por la hormona de la expresión de determinados neuropéptidos implicados en la regulación de la ingesta de alimentos (Bjorbaek and Kahn 2004).

1.1.2.4 AMPK (5'-AMP-Activated Protein Kinase).

La principal función de la AMPK en el músculo esquelético es la de estimular la oxidación de ácidos grasos al fosforilar a la ACC (*Acetil Coenzima-A Carboxilasa*), actuando como un "sensor de combustible" que controla el estatus energético de las células (Minokoshi et al. 2002; Tanaka et al. 2005). La ACC fosforilada queda inactivada y deja de producir malonil-CoA (Jorgensen and Rose 2008). Además, también se ha demostrado que un incremento de la actividad de la AMPK muscular produce un aumento del transporte de glucosa al interior de la fibra (Steinberg and Jorgensen 2007). Este aumento del consumo de glucosa se asocia a la fosforilación de la proteína AS160 (substrato de AKT de 160 KDa, también conocida como RabGAP (*Rab GTPase-activating protein*)) (Treebak et al. 2007). La AS160 también se fosforila en respuesta a la estimulación por insulina. Esta última evidencia experimental vuelve a poner de manifiesto la interacción en la señalización activada por insulina y leptina (Treebak et al. 2007).

En los últimos años se han aportado numerosas evidencias experimentales que documentan ampliamente los efectos de la leptina sobre esta importante vía de señalización. Un estudio particularmente interesante ha demostrado que la inyección intravenosa de leptina incrementa la fosforilación de la AMPKα2 en músculo esquelético de ratones db/db, efecto que es más acusado en las fibras de contracción lenta y que depende de la unión de la leptina al receptor OB-Rb (Minokoshi et al. 2002). Existen estudios realizados en ratones transgénicos que sobre-expresan leptina que han demostrado que los niveles permanentemente elevados de la hormona producen activación crónica de la AMPK en las fibras musculares lentas. Existen estudios realizados en ratones knockout que sobreexpresan la leptina en el hígado. son delgados y adelgazan más rápidamente que los ratones salvajes cuando son sometidos a una dieta hipercalórica. Pero es especialmente importante destacar que a pesar de presentar unos niveles crónicamente elevados de leptina, no muestran signos de resistencia a la acción de la hormona, contrariamente a lo observado en seres humanos obesos que presentan hiperleptinemia y resistencia a la acción de la leptina (Tanaka et al. 2005). No obstante, la activación de AMPK por leptina también podría depender de la isoforma corta del receptor OB-Ra (Uotani et al. 2006). En contraste con lo observado en los ratones transgénicos, la actividad basal de la AMPK parece no estar modificada en obesos (Steinberg et al. 2004a) o ligeramente disminuida (Bandyopadhyay et al. 2006), tal vez debido a la resistencia a la acción de la leptina.

1.1.3 Ejercicio y sensibilidad muscular a la leptina.

Existen numerosos estudios que demuestran que la señalización mediada por OB-Rb y activada por leptina está sometida a un sistema de control de retroalimentación negativa regulado por las proteínas SOCS (Sahu 2003). Cuando los niveles de leptina están permanentemente elevados en sangre, la hormona induce la expresión génica de SOCS3 a través de STAT3. El producto proteico de SOCS3 es capaz de interaccionar con el residuo fosforilado Y985 de OB-Rb y con JAK2 bloqueando la señalización activada por leptina

(Bjorbaek et al. 1999; Bjorbaek and Kahn 2004; Eyckerman et al. 2000) (Figura 3). Puesto gue el incremento de la expresión de SOCS3 inducido por niveles permanentemente elevados de leptina es capaz de inhibir la fosforilación en residuos de tirosina de OB-R, uno de los mecanismos propuestos para explicar el fenómeno de la resistencia a la leptina es precisamente un cambio en la expresión endógena de SOCS3 (Bjorbaek et al. 2000; Munzberg and Myers 2005). Los ratones knockout para SOCS3 (SOCS3 -/+) tienen incrementada la sensibilidad a la leptina con respecto a los ratones salvajes, puesto que la inyección de esta hormona en los primeros es mucho más efectiva reduciendo el peso corporal y activando la señalización a partir del OB-Rb (Myers 2004). Además, la inhibición de la expresión de SOCS3 por medio de técnicas de ARN de interferencia, incrementa la fosforilación de JAK2 y de STAT3. Los autores de este estudio demostraron que el bloqueo de la expresión de SOCS3 no sólo incrementaba en gran medida la fosforilación de ERK, sino que además bloqueaba el descenso de esta señal tras una estimulación prolongada del receptor. De esta forma, parece plausible un potencial mecanismo de inhibición de la señalización mediada por ERK y probablemente por JAK2, independiente de Y985 y dependiente de Y1138, y producido por un incremento de la expresión de SOCS3 debida a una estimulación prolongada de la cola intracelular de OB-Rb (Dunn et al. 2005; Munzberg and Myers 2005). Más recientemente se ha demostrado que la sobre-expresión de SOCS3 inhibe el incremento de fosforilación de AMPK y ACC inducido por la leptina en células de músculo esquelético (Steinberg and Jorgensen 2007; Steinberg et al. 2006a).

El sistema de retroalimentación negativa mediado por SOCS3 explica porque en una condición patológica como es la obesidad en la que los niveles circulantes de leptina están permanentemente elevados, la hormona es incapaz de inducir un descenso del peso corporal, lo cual a su vez indica que en la mayoría de los casos la obesidad en humanos representa una forma de resistencia a la leptina (Banks et al. 2000). De hecho, aunque se ha observado que la administración exógena de leptina es capaz de producir un descenso del peso corporal en obesos, esta reducción ha sido cuando menos modesta a las dosis de hormona testadas (Bates and Myers 2003; Dunn et al. 2005; Myers 2004).

Otro regulador negativo de la señalización por leptina es la proteína PTP1B (*Protein Tyrosine Phosphatase 1B*), la cual es capaz de regularla a través de la desfosforilación de JAK2 (Cook and Unger 2002; Kaszubska et al. 2002; Zabolotny et al. 2002) (Figura 3). La implicación de PTP1B en la regulación de las vías de señalización dependientes de leptina ha

32

sido demostrada en estudios en los que se administró leptina a ratones *knockout* para PTP1B, observándose una hipersensibilidad a los efectos fisiológicos de la hormona en lo que se refiere al control del peso corporal (Zabolotny et al. 2002). Además, diversos estudios han demostrado que PTP1B es un importante regulador fisiológico negativo de la señalización mediada por insulina puesto que es capaz de de-fosforilar al receptor de insulina (IR) (Bjorbaek and Kahn 2004; Elchebly et al. 1999; Klaman et al. 2000). Además, la expresión proteica de PTP1B podría estar incrementada en músculo esquelético obeso y ésta sobre-expresión de PTP1B podría estar modulada por la inflamación que muchas veces acompaña a la obesidad (Zabolotny et al. 2008).

Por otro lado, también se ha demostrado la implicación de la proteína C reactiva en la modulación de la sensibilidad a la leptina, observándose la interacción de esta proteína con la leptina en sangre lo que impediría la unión a su receptor, bloqueando por tanto las acciones fisiológicas de la hormona (Chen et al. 2006).

El fenómeno de la resistencia a la leptina ha sido observado también en tejidos periféricos, como por ejemplo el músculo esquelético. Las dietas ricas en grasas producen resistencia a la leptina en el músculo esquelético de la rata, lo que incrementa la acumulación intramuscular de triacilglicerol (TG) y conduce en última instancia al desarrollo de la resistencia a la insulina típicamente observada en obesidad (Steinberg and Dyck 2000). Más recientemente, se ha publicado la primera evidencia experimental de la existencia de resistencia a la leptina en músculo esquelético humano. En este estudio se demuestra que la leptina es incapaz de reducir la acumulación de TG en músculo esquelético de individuos obesos pero si lo hace en tejido muscular de sujetos delgados (Steinberg et al. 2002).

La práctica de actividad física también es capaz de producir cambios en el nivel de activación de esta importante vía de señalización. Investigaciones recientes demuestran que el ejercicio produce un incremento de la fosforilación de ERK en músculo esquelético humano. Así, Creer y col. (2005) comprobaron que diez minutos después de haber realizado treinta repeticiones de un ejercicio de extensión de una pierna al 70% de su intensidad máxima, se producía un incremento significativo de la fosforilación de ERK en el vasto lateral del cuadriceps de ciclistas. Sin embargo, se desconoce cómo leptina y ejercicio pueden interactuar sobre la activación de ERK.

En lo que se refiere a los efectos del ejercicio físico sobre la señalización mediada por AMPK, se ha descrito que la actividad AMPK aumenta en respuesta al ejercicio pero sólo

cuando la intensidad es superior al 50% del VO_{2max} (Fujii et al. 2000; Wojtaszewski et al. 2000). Si la intensidad del ejercicio es inferior, la actividad AMPK sólo aumenta si el esfuerzo se desarrolla hasta la extenuación (Wojtaszewski et al. 2002). La estimulación de AMPK por el ejercicio es rápida puesto que este incremento se comienza a detectar ya a los cinco minutos después del inicio del mismo, manteniéndose elevada durante el resto del ejercicio (Stephens et al. 2002). Estudios más recientes han demostrado que ejercicios de alta intensidad, que producen el agotamiento entre treinta segundos y dos minutos, también inducen un incremento de la activación de AMPK (Birk and Wojtaszewski 2006). Ejercicios realizados al 70% del VO_{2max} en cicloergómetro también se han asociado, en seres humanos, a un aumento de la fracción fosforilada de AS160, tras una hora de esfuerzo (Treebak et al. 2007). En cambio, en esfuerzos de 2 min (110% pico de potencia máx.), o de 30 s (sprint máximo), no se han observado cambios en el grado de fosforilación de la AS160 (Treebak et al. 2007).

Recientemente se ha comunicado que la fosforilación de AS160 durante el ejercicio está, al menos en parte, mediada por la activación del heterotrímero de AMPK $\alpha 2/\beta 2/\gamma 1$ (Treebak et al. 2007). Otro estudio particularmente interesante ha demostrado que en las mujeres el grado de activación AMPK es superior a la observada en hombres cuando realizan ejercicio durante noventa minutos al 60% del VO₂max (Roepstorff et al. 2006).

En cuanto a la influencia del ejercicio físico sobre esta vía de señalización, la mayoría de los estudios relacionados con IRS/PI3K y ejercicio en humanos hacen referencia a la activación inducida por la insulina y no a la señalización debida a la leptina. Por ejemplo, Kirwan y col. (2000), investigaron los efectos del ejercicio regular sobre la activación de PI3K. Para ello realizaron un estudio en el que llevaron a cabo un clamp hiperinsulinémico (40 mU·m²·min¹) y euglucémico (5.0 mM) durante dos horas a ocho sujetos sanos entrenados y a ocho hombres y mujeres sanos sedentarios. Posteriormente, los autores analizaron la activación de PI3K mediada por IRS-1 antes y después del clamp en biopsias tomadas del vasto lateral del cuádriceps. Los resultados aportados por este estudio demostraron que la activación de PI3K fue mayor en los sujetos entrenados que en los sedentarios. El consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}), indicador de la capacidad aeróbica, correlacionó positivamente con la activación de PI3K. Además, el incremento de actividad de PI3K también correlacionó positivamente con la tasa de eliminación de glucosa vía insulina. Las evidencias experimentales aportadas por esta investigación sugieren que la práctica regular de actividad física incrementa la activación de PI3K inducida por insulina y mediada por IRS-1 (Kirwan et al.

34

2000), lo cual es un indicativo al menos indirecto de un aumento de la sensibilidad muscular a la hormona. Sin embargo, cabe destacar que recientemente se han publicado dos estudios que también han investigado los efectos del ejercicio físico sobre la activación mediada por insulina de PI3K y que han arrojado resultados contradictorios. Frosig y col. (2007), estudiaron este fenómeno en músculo esquelético humano estimulado con insulina y sometido a entrenamiento de resistencia. Los autores observaron que el ejercicio reducía la activación de PI3K mediada por IRS-1 tanto en condiciones basales como de estimulación con la hormona. Estas evidencias experimentales sugieren que, contrariamente a lo que se pensaba hasta el momento, este tipo de entrenamiento es incapaz de aumentar la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético humano. Sin embargo, otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación sí que ha demostrado que el ejercicio agudo interacciona con la señalización activada por insulina a través de IRS-2 y PI3K para incrementar la capacidad de síntesis proteica en músculo esquelético humano, lo que sí se puede entender como un aumento de la sensibilidad a la hormona (Frosig et al. 2007). Los resultados aportados por este último estudio son muy relevantes puesto que existen otras investigaciones que demuestran que la leptina es capaz de inducir la activación de PI3K a través de IRS-2 (Benomar et al. 2005; Kellerer et al. 1997). En conclusión, podemos decir que el fenómeno de la interacción entre las vías activadas por leptina e insulina está muy bien documentado, pero sin embargo también resulta obvio que se requieren más estudios que aporten resultados concluyentes para aclarar la importancia de esta interacción en tejidos periféricos como el músculo esquelético humano, sobre todo teniendo en cuenta el papel que juega el músculo esquelético en la sensibilidad a la insulina y en el mantenimiento de la glucemia. Es necesario profundizar en el conocimiento de los diferentes mecanismos bioquímicos y moleculares que gobiernan la sensibilidad muscular a la leptina y de cómo la práctica regular de actividad física podría modular este fenómeno. Esto podría permitir la implementación de aproximaciones terapéuticas novedosas y efectivas para el tratamiento de la obesidad.

1.2 Efectos del entrenamiento de fuerza sobre la masa muscular en adultos.

La mayoría de los programas de ejercicio instaurados para combatir la obesidad se han basado principalmente en la realización de ejercicios aeróbicos (Kelley et al. 2005), es decir ejercicios de intensidad moderada o baja y larga duración, mientras que se ha prestado escasa atención a la actividad física basada en ejercicios de fuerza (Stefanick 1993; Volek et al. 2005). Posiblemente los ejercicios de fuerza han sido rechazados por varias razones. En primer lugar, porque los programas basados en ejercicios de fuerza pueden no inducir pérdidas de masa corporal tan marcadas como los programas aeróbicos (Andersen et al. 1999; Ball et al. 2001; Bassett et al. 2004; Bond Brill et al. 2002; Borg et al. 2002; Campbell et al. 2007; Cooper et al. 2000; Christ et al. 2004; Davis et al. 2006; Drovvold et al. 2004; French et al. 2007; Schmitz et al. 2000). No obstante, este efecto es debido a que con el entrenamiento de fuerza se produce un aumento de la masa muscular, con el consiguiente mantenimiento del peso corporal (Fenkci et al. 2006; Hunter et al. 2002; Ibanez et al. 2005; Klimcakova et al. 2006; Lemmer et al. 2001; Olson et al. 2007; Polak et al. 2005; Schmitz et al. 2007; Schmitz et al. 2003). Otra razón podría residir en la creencia, tan extendida como infundada, de que el entrenamiento de fuerza es menos beneficioso para la salud que el entrenamiento aeróbico. Por ejemplo, se ha pensado que el entrenamiento de fuerza puede ser incluso inadecuado para personas con hipertensión arterial, cuando los datos experimentales muestran todo lo contrario (Stewart et al. 2005).

El entrenamiento de fuerza promueve una serie de adaptaciones fisiológicas que pueden ser beneficiosas para facilitar un descenso de la masa grasa y de los factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad (Tabla 1). Por ejemplo, el entrenamiento de fuerza se asocia a un aumento de la masa muscular y a un descenso de la masa grasa (Hakkinen et al. 1990; Hickson et al. 1994; Ibanez et al. 2005; McCall et al. 1996; Rankin et al. 2004).

Variable	Entrenamiento Resistencia	Entrenamiento Fuerza	
Masa grasa	↓ ↓	ţ	
Masa muscular	$ \longleftrightarrow $	† †	
Fuerza	$ \leftrightarrow $	† † †	
Resistencia física	† † †	† †	
Sensibilidad a la Ins	sulina 🕇 🕇	† †	
Metabolismo basal	t	† †	
Îndica incremento; ↓ disminución; → sin efecto.			

Tabla 1. Comparación de los efectos del entrenamiento de resistencia y de fuerza con respecto a variables de salud y estado físico. Modificada de McArdle (McArdle WD 2001).

El aumento de masa muscular con el entrenamiento de fuerza puede además tener varios efectos positivos. En primer lugar, durante el proceso de hipertrofia muscular es necesario destinar una parte importante de las calorías ingeridas al sostenimiento de la síntesis de proteínas, lo que facilita la instauración de un balance energético negativo (Jakicic et al. 2001). En segundo lugar, el incremento de la masa muscular se asocia a un aumento del metabolismo basal (Lemmer et al. 2001). Además, el entrenamiento de fuerza produce una serie de adaptaciones neuroendocrinas que también pueden facilitar la pérdida de masa grasa. Por ejemplo, se ha constatado un incremento de la concentración plasmática de testosterona durante la sesión de entrenamiento de fuerza y durante los 15-60 minutos siguientes (Hakkinen et al. 1998; Kraemer et al. 1998). Aunque el gasto energético asociado con el entrenamiento de fuerza no es excesivamente grande, éste puede incrementar la masa muscular (a través de la

síntesis proteica), lo cual conlleva un aumento del gasto energético en las siguientes 24 horas al entrenamiento (Figura 4) (Donnelly et al. 2009).



Figura 4. Modelo conceptual del entrenamiento de fuerza y los efectos potenciales sobre el gasto energético. Un modelo conceptual que incluye tanto el gasto energético del incremento de la masa muscular como el gasto energético potencial del incremento de las actividades libres diarias. TMB, tasa metabólica basal. Modificado de Donnelly y col. (2009).

1.2.1 Tipos de fibra muscular.

El músculo esquelético no es homogéneo, sino que está formado por fibras musculares con distintas propiedades funcionales y metabólicas, que se agrupan en unidades funcionales llamadas unidades motoras. Todas las fibras de una misma unidad motora están inervadas por la misma motoneurona y tienen propiedades mecánicas y metabólicas casi idénticas. Aunque hasta hace no mucho tiempo, ha existido una considerable confusión sobre el método y la terminología a utilizar, se han identificado y clasificado dos tipos de fibras musculares, atendiendo a sus características histoquímicas, metabólicas y contráctiles (Armstrong 1988; Brooke and Kaiser 1970). Por un lado, están las fibras tipo I (o *slow-twitch fibers*), que generan energía para la resíntesis de adenosín trifosfato (ATP) principalmente a través del sistema aeróbico, lo que las hace muy aptas para el trabajo aeróbico prolongado. La fibras tipo I se distinguen por poseer una velocidad de contracción baja, un nivel bajo de la actividad miosina ATPasa y numerosas mitocondrias que, junto con los elevados niveles de mioglobina, les confieren una pigmentación rojiza característica y una capacidad glucolítica peor desarrollada que las fibras tipo II (o *fast-twitch fibers*). Éstas tienen mayor capacidad para la transmisión de
potenciales de acción y mayor nivel de actividad de la miosina ATPasa, y por eso, su velocidad intrínseca de contracción y de desarrollo de tensión es de 2 a 3 veces más rápida que en las fibras tipo I. Las fibras tipo II presintetizan ATP a traves del metabolismo energético aerobio y anaerobio, característicamente tienen menor capacidad aeróbica y mayor capacidad anaeróbica que las fibras tipo I. Estas fibras de contracción rápida se activan principalmente en ejercicios de corta duración y explosivos, como sprints, así como durante contracciones musculares potentes que dependen casi exclusivamente del metabolismo anaeróbico (Gorostiaga 2005; López Chicharro and Fernandez Vaguero 2006; McArdle WD 2001). Las características contráctiles y metabólicas de las fibras tipo II hacen que sean muy importantes en deportes y ejercicios físicos en los cuales durante su desarrollo se producen cambios frecuentes de ritmo como en el baloncesto, fútbol o hockey. Las fibras tipo II se subdividen en: Ila, que son consideradas como intermedias entre tipo I y II, porque a su velocidad de contracción rápida se une un desarrollo bastante aceptable tanto de la vía aeróbica como de la anaeróbica; y IIx, que poseen el mayor potencial anaeróbico, pero son menos adecuadas para el ejercicio prolongado de baja intensidad, debido a su menor capacidad oxidativa (Gorostiaga 2005; López Chicharro and Fernandez Vaguero 2006; McArdle WD 2001).

Hasta hace poco se consideraba que la histoquímica de la miosina ATPasa era capaz de reflejar de forma precisa la expresión de las diferentes isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC), de las fibras musculares aisladas. Sin embargo, trabajos más recientes han revelado que con ésta técnica sólo se puede identificar la isoforma de MyHC predominante en la fibra muscular aislada (Pehme et al. 2004; Staron and Pette 1987), pero como una fibra muscular puede contener más de una isoforma MyHC (Staron and Pette 1987), la histoquímica de la ATPasa podría no ser una técnica suficientemente sensible para reflejar las características contráctiles de cada fibra. Según estas técnicas, las isoformas de MyHC son tres, I, Ila y IIx (Schiaffino and Reggiani 1994; Serrano et al. 2001). Diferentes estudios en animales y humanos indican que el tipo IIx MyHC es el más capacitado para el desarrollo de fuerza y potencia (IIx>IIa>I). Además, la velocidad de acortamiento de las fibras tipo IIx es aproximadamente 10 veces mayor que las de tipo I MyHC (Bottinelli et al. 1999).

En cuanto a la distribución muscular de estas fibras, existe una variabilidad elevada dependiendo del sujeto estudiado y de la actividad a la que haya estado sometiendo el músculo estudiado. Sin embargo, existe una clara influencia genética en el porcentaje de fibras que posee una persona con respecto a otra, siendo posible modificar este porcentaje pero sólo

39

hasta cierto punto. Además, debemos tener en cuenta que la composición porcentual de fibras en una persona no es, desde luego, el único determinante de su rendimiento físico. Éste será el resultado final de una serie de variables fisiológicas, bioquímicas, neurológicas y biomecánicas (Klausen et al. 1981). Harber y col. (2002) demostraron en varones sedentarios, atletas de fondo y medio fondo y deportistas a nivel recreativo, mediante la técnica de la electroforesis que los deportistas de fondo y medio fondo poseen un nivel de isoformas tipo l MyHC mayor que el resto de los sujetos, y un menor porcentaje de isoformas tipo Ila, Ilx.

Las fibras rápidas tipo IIa presentan una mayor facilidad para hipertrofiarse en respuesta al entrenamiento de fuerza que las fibras tipo I (Alway et al. 1989; Hather et al. 1991; Tarpenning et al. 2001). Con el entrenamiento de fuerza las fibras tipo IIx se transforman progresivamente en fibras tipo IIa (Malisoux et al. 2007). Recientemente se ha publicado una investigación en la que se demuestra que independientemente de la intensidad (60%1RM o 30% 1RM) y el volumen (5 días/sem ó 8 días/sem) el entrenamiento de fuerza a corto plazo produce una disminución similar (-10.2%) en la MyHC tipo IIx del músculo tríceps braquial, acompañado por un incremento de un 9.4% en la MyHC tipo IIa (Gjovaag and Dahl 2008). Por otro lado, Holm y col. (2008) han demostrado que en un entrenamiento de 12 semanas en el que los individuos entrenan una pierna al 70% y la otra al 16% de su 1RM, a pesar de realizar el mismo volumen total, los sujetos que entrenaron con la carga más ligera, alcanzaron un ligera pero significativa hipertrofia sin mostrar modificaciones en el porcentaje de la expresión proteica de las isoformas MyHC. Sin embargo, el grupo que entrenó con una intensidad más elevada logró un mayor grado de hipertrofia y sí se vieron modificados los distintos porcentajes de MyHC (Holm et al. 2008).

1.2.2 Respuesta molecular al entrenamiento de fuerza y resistencia.

Actualmente, los avances en biología molecular han clarificado algunos de los mecanismos que regulan el crecimiento muscular. Este progreso ha abierto varias líneas de investigación sobre el estudio de la hipertrofia generada por el entrenamiento de fuerza y ha mejorado nuestro conocimiento sobre este complejo fenómeno. La ganancia de masa muscular producida por el entrenamiento de fuerza es un fenómeno complejo que depende de numerosos sistemas fisiológicos y vías de señalización. El crecimiento muscular ocurre siguiendo una cascada secuencial de eventos que comprenden: (1) activación del músculo; (2) señalización procedente de la deformación mecánica de las fibras musculares, hormonas y sistema inmune que responden frente al estímulo del entrenamiento de fuerza; (3) síntesis proteica debida a una mayor trascripción y traducción; e (4) hipertrofia de la fibra muscular.

1. <u>La activación del músculo</u>: Durante el entrenamiento de fuerza, las motoneuronas α activan las fibras musculares para producir fuerza. Esta interacción neuromuscular determina qué tipo de fibras musculares se activan y la cantidad de fuerza que van a ejercer. Específicamente, existen dos variables que regulan la fuerza de la contracción muscular: la frecuencia de impulsos neurales y el número de unidades motoras reclutadas. El "principio del tamaño" de Henneman describe esta última variable, y explica que el reclutamiento neuronal del tejido muscular empieza con las unidades motoras más pequeñas (principalmente tipo I) y continúa hacia unidades motoras mayores (principalmente tipo II), hasta que la producción de fuerza alcanza los niveles requeridos (Henneman et al. 1965).

En la práctica, este principio asegura que las actividades que implican cargas ligeras reclutan principalmente unidades motoras tipo I, que son, por otro lado, resistentes a la fatiga. Si los requerimientos de desarrollo de fuerza aumentan, (por ejemplo, incrementar la carga en un entrenamiento de fuerza), se reclutan unidades motoras con un límite de estímulo más alto. Los entrenamientos de fuerza que incluyen cargas cercanas al 1RM activan el espectro completo de unidades motoras. Aunque el principio del tamaño describe apropiadamente la relación entre la carga del ejercicio y la activación muscular, existen dos excepciones importantes a tener en cuenta: los ejercicios efectuados de forma explosiva (por ejemplo, levantamientos de pesas tipo olímpico), y los ejercicios efectuados en presencia de la fatiga muscular.

Para acelerar la carga de una forma rápida, es necesario aplicar más fuerza (porque fuerza = masa x aceleración) y por tanto, como se predice en el principio de Henneman, se reclutan unidades motoras con límite de activación alto. En este sentido, si comparamos contracciones musculares explosivas de tipo concéntrico usando una carga ligera (por ejemplo, 40% de la fuerza máxima isométrica) con el mismo ejercicio realizado con una carga más pesada (67% de la fuerza isométrica máxima) a una velocidad más lenta, la actividad electromiográfica (EMG) es mayor en el ejercicio de carga ligera (Linnamo et al. 2000).

La fatiga que se produce realizando ejercicio físico también aumenta la actividad EMG (Pincivero et al. 2006). Esto indica una mayor contribución de las unidades motoras de tipo II para mantener la intensidad de fuerza requerida cuando las unidades motoras tipo I comienzan

41

a fatigarse. En este sentido, Izquierdo y col. (2009a) estudiaron los efectos de 7 semanas de entrenamiento de fuerza de alta intensidad sobre el ratio de desarrollo de la fatiga, usando las mismas cargas relativas y absolutas antes y después de la intervención. El periodo de entrenamiento produjo un aumento significativo de la MyHC tipo Ila y un descenso de las isoformas MCH I y IIx. Este estudio muestra que durante contracciones dinámicas de los músculos extensores de las piernas, ambos protocolos con la misma carga relativa realizados antes y después del entrenamiento llevaron a una mayor fatiga neuromuscular. Este hecho fue observado por el incremento agudo en la amplitud de la señal electromiográfica (EMG) de superficie. Tras el entrenamiento, los signos de fatiga inducidos por el ejercicio agudo en el protocolo con la misma carga absoluta fueron mucho menores que los observados antes de la intervención. La mayor amplitud en las mediciones de EMG y el descenso en la frecuencia media en presencia de fatiga en el protocolo relativo pueden ser atribuidos a un mayor reclutamiento de unidades motoras y/o una mayor sincronización espacial o temporal de unidades motoras, presumiblemente para compensar la fatiga muscular (Potvin 1997). Por tanto, además de las cargas, el hecho de realizar los ejercicios de forma explosiva y la consecuente fatiga que esto produce pueden modificar los patrones de reclutamiento de las unidades motoras durante el ejercicio de fuerza.

En resumen, la carga, la velocidad de desarrollo de la fuerza (RFD, *Rate of Force Development*) y la fatiga muscular afectan al reclutamiento de las unidades motoras. El reclutamiento (y el fenotipo de las unidades motoras reclutadas) deben ser tenidas en cuenta a la hora de cuantificar las adaptaciones al entrenamiento de fuerza por varias razones: a) sólo las unidades motoras reclutadas son capaces de responder y adaptarse al entrenamiento (Gabriel et al. 2006); b) las cargas altas, ejercicios explosivos y/o fatiga muscular son necesarios para activar las unidades motoras tipo II (Spiering et al. 2008); c) las fibras musculares tipo I y II desarrollan respuestas de señalización diferentes frente a la contracción (Parkington et al. 2003; Spiering et al. 2008); d) las fibras tipo I (McCall et al. 1996; Terzis et al. 2008); e) el porcentaje de fibras musculares varía dependiendo del grupo muscular (por ejemplo, en humanos, los músculos gemelos poseen aproximadamente un 60% de fibras tipo I y el músculo sóleo un 85% de fibras tipo I) (Trappe et al. 2001), en cambio el tríceps braquial tiene más de un 60% de fibras tipo II (Sanchis-Moysi et al. 2009).

2. <u>Señalización procedente de deformación mecánica de las fibras musculares:</u> la estimulación mecánica de la fibra muscular (por contracción o estiramiento) estimula varias vías de señalización en el músculo que son independientes de los cambios hormonales y factores de crecimiento (Atherton et al. 2005; Hornberger et al. 2004; Spiering et al. 2008). En concreto, la deformación mecánica activa las vías de señalización de la proteína quinasa B (Akt), de la proteína quinasa de mamíferos diana de la rapamicina (mTOR), la proteina quinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK), y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). La vía mTOR es crucial para las adaptaciones al entrenamiento de fuerza (Bodine et al. 2001); sin embargo, el papel de la señalización por AMPK y MAPK no ha sido aclarado del todo. Cuando las fibras musculares se contraen, la señalización por Akt-mTOR aumenta de manera marcada y esta respuesta es crítica para incrementar la síntesis proteica en el músculo (Frost and Lang 2007; Hornberger et al. 2004), y su consiguiente hipertrofia (Bodine et al. 2001). Akt fosforila y activa mTOR durante la sobrecarga muscular (Bolster et al. 2004; Frost and Lang 2007).

Por otro lado, la señalización de mTOR tras la estimulación mecánica puede también ocurrir independientemente de Akt (Hornberger et al. 2004). Esta señalización inducida por estimulación mecánica independiente de Akt ocurre a través de la producción de ácido fosfatídico promovido por el gen de la fosfolipasa D (Hornberger et al. 2006). En reposo, la α -actinina que se encuentra en la banda Z de los sarcómeros se asocia con la fosfolipasa D y la inhibe. Sin embargo, como proponen Hornberger y col. (2006), la fosfolipasa D se disocia de la α -actinina durante las deformaciones mecánicas repetitivas, produciendo su inhibición mediada por la α -actinina y por tanto, promoviendo la producción de ácido fosfatídico y la activación de mTOR.

La cascada de señalización de mTOR incrementa la síntesis proteica mediante la mejora de la eficacia de la traducción (por ejemplo, aumentando la cantidad de ARNm traducido por ribosoma). Una vez activada, mTOR fosforila a dos dianas principales: la proteína ribosómica de 70 kDa (p70 S6K) y la proteína de unión 1 del factor eucoariótico de iniciación de la traducción 4E (4E-BP1) (Spiering et al. 2008). A la par que mTOR, Akt también fosforila a la quinasa de la proteína glucógeno sintasa-3β (GSK-3β) y a la familia de factores de transcripción "fork-head box O" (FOXO). Akt fosforila e inhibe a GSK-3β, la cual libera la inhibición de elF2B. La activación de elF2B resulta en la interacción methionyl-ARNm con la subunidad 40S para el inicio de la traducción y la síntesis de proteínas. La fosforilación de

FOXO mediada por Akt impide que la primera estimule la transcripción de ubiquitin-ligasas proteolíticas (Sartorelli and Fulco 2004) (Figura 5).



Figura 5. Vías de Señalización activadas en la hipertrofia y atrofia. Las flechas verdes indican la fosforilación que activa al substrato. Mientras que las flechas rojas se refieren a fosforilaciones que inactivan el substrato. Tomado de Sartorelli y col.(2004).

Como ya se comentó anteriormente la AMPK es considerada un "master switch metabólico" de la célula, puesto que se activa cuando las concentraciones de AMP son altas y las de ATP y glucógeno bajas (Hardie et al. 2006). En respuesta a este descenso de la energía disponible, como ocurre por ejemplo durante la contracción muscular, la AMPK estimula vías de señalización relacionadas con la liberación de energía (por ejemplo, oxidación de glucosa y ácidos grasos) e inhibe las vías de señalización que consumen energía (por ejemplo, la síntesis proteica) (Treebak and Wojtaszewski 2008). La mayoría de las investigaciones se

centran en el papel de la AMPK en las adaptaciones al entrenamiento de resistencia (Winder et al. 2006). Sin embargo, la AMPK puede jugar un papel importante en lo que respecta a las adaptaciones al entrenamiento de fuerza. Por ejemplo, la AMPK reduce la síntesis de proteínas a través de la inhibición de la cascada de señalización mTOR (Bolster et al. 2002). Además, la actividad AMPK aumenta de forma transitoria tras una sesión de entrenamiento de fuerza, y retorna a los valores iniciales en las dos horas siguientes al ejercicio (Dreyer et al. 2006). Sin embargo, y como conclusión, la escasa información al respecto hace necesario que se realicen más estudios que confirmen la importancia de la AMPK en las respuestas y adaptaciones al entrenamiento de fuerza.

La vía de señalización MAPK constituye una compleja red de cascadas de fosforilación paralelas. Estas vías se dividen generalmente en cuatro subfamilias: las quinasas ERK 1 y 2 (*Extracellular Regulated Kinases*), p38 MAPK, la quinasa c-Jun NH2-terminal y ERK5. Las MAPKs ejercen sus efectos celulares fosforilando y activando varios factores de transcripción y coactivadores (Long et al. 2004). Además, las MAPKs también fosforilan histonas, (proteínas que permiten la compactación del ADN para formar la cromatina) alterando así la densidad o estructura de la cromatina y provocando la activación de genes específicos (Hawley and Zierath 2004). Aunque se ha demostrado que la actividad de MAPK se incrementa tras ejercicio agudo de fuerza en humanos, (Coffey et al. 2006), la importancia de la señalización activada por MAPK para mediar las adaptaciones al entrenamiento de fuerza debe ser estudiada con más detalle (Long et al. 2004) (Figura 6).

2.1 <u>Respuestas hormonales del tejido muscular al entrenamiento de fuerza:</u> existen factores endocrinos que influencian el crecimiento del músculo y su desarrollo a lo largo de la vida. Asimismo, estados de exceso o deficiencia en los niveles hormonales afectan al músculo tanto en su estructura como en su función (Veldhuis et al. 2005). Por tanto, es importante señalar algunos de los factores endocrinos principales que afectan el estado de equilibrio dinámico entre los estímulos anabólicos y catabólicos en el músculo.

El entrenamiento de fuerza produce respuestas hormonales de mayor o menor intensidad dependiendo de las características del programa de entrenamiento, y estas respuestas vienen dadas principalmente por la hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento insulinodependiente 1 (IGF-1), y la testosterona (T) (Kraemer et al. 1990; Kraemer and Ratamess 2005). También es importante tener en cuenta que se puede ganar fuerza

(Hansen et al. 2001) e hipertrofiar la musculatura (Wilkinson et al. 2006) sin que estas adaptaciones se acompañen de cambios en las hormonas circulantes, indicando que las respuestas hormonales potencian, pero no son las únicas responsables de las adaptaciones de la musculatura al entrenamiento de fuerza.

Hormona del crecimiento (GH). La hormona del crecimiento es en realidad una "familia de hormonas" puesto que existen más de 100 variantes en el torrente sanguíneo (Baumann 1991). La GH posee una gran variedad de efectos anabólicos y se ha demostrado que aumenta la masa muscular libre de grasa, densidad mineral ósea y reduce la masa grasa en niños, adultos jóvenes y ancianos con deficiencia de esta hormona (Carroll et al. 2004). Con la edad, la secreción de GH y el IGF-1 sistémico disminuyen, y la administración de GH a sujetos ancianos resulta en cambios en la composición corporal similares a aquellos sujetos jóvenes con deficiencia en esta hormona (Borst 2004). Asimismo, cuando se administra GH recombinante (rhGH) a hombres jóvenes hipogonadales (Hayes et al. 2001) se ha visto un incremento del ARNm de IGF-1. Aperghis y col. (Aperghis et al. 2009) evaluaron los efectos de la administración de GH recombinante en siete sujetos que participaron en un estudio con un diseño crossover durante dos semanas y demostrando que se producía un incremento de los niveles circulantes de IGF-1 sin que se produjera un cambio en la expresión de la transcripción de IGF-1 en el vasto lateral. Estos resultados contrastan con los observados en un estudio previo en el que ancianos con una deficiencia en GH mostraron un aumento de IGF-1 3' splice tras la administración de rhGH con ó sin entrenamiento de fuerza (Hameed et al. 2004). En estudios en ancianos que combinan el efecto de la GH y el ejercicio físico, no se ha observado ni una hipertrofia de las fibras musculares, ni un aumento en la expresión de GH-IGF (Taaffe et al. 1996).

La actividad biológica específica de cada una de las variantes de la GH no está completamente determinada, sin embargo, los ejercicios de fuerza afectan en gran medida sus concentraciones (Hymer et al. 2001; Nindl 2007; Nindl et al. 2003). También se ha observado que la actividad biológica de varias variantes moleculares de GH aumenta con el entrenamiento crónico de fuerza en mujeres (Kraemer et al. 2006). La unión de la GH con su receptor de membrana inicia la cascada de señalización de JAK2. JAK2 posee substratos "downstream" implicados en importantes funciones celulares. Dentro de estos substratos cabe resaltar PI-3K, porque esta quinasa influye en la señalización Akt-mTOR, y presumiblemente la

respuesta de la GH al entrenamiento de fuerza promueve la eficiencia traduccional y el anabolismo muscular (Piwien-Pilipuk et al. 2002). Experimentos "*in vivo*" apoyan esta hipótesis, puesto que inyectar GH a cerdos (150 µg/kg/día) aumenta la cantidad de músculo esquelético, la actividad elF2B y fosforilación 4E-BP1 resultando en una mayor eficiencia en la traducción y en la síntesis de proteínas (Bush et al. 2003).

Factor de crecimiento insulinodependiente 1 (IGF). En los últimos años se han aportado evidencias experimentales que demuestran que el entrenamiento de fuerza produce un incremento de las concentraciones de IGF-1 circulante (Kraemer et al. 1990; Kraemer and Ratamess 2005) y muscular (Bamman et al. 2001). Además, el entrenamiento de fuerza altera las concentraciones de las proteínas de unión a IGF, que influencian la actividad biológica de IGF-1 (Hymer et al. 2001). En cuanto a las vías de señalización, IGF-1 estimula la hipertrofia muscular a través de PI-3K-Akt-mTOR (Nindl et al. 2001; Rommel et al. 2001). Además de esta vía IGF-1 estimula la proliferación y diferenciación de unas células madre localizadas en la periferia de las fibras musculares y que reciben el nombre de células satélite. La activación, proliferación y diferenciación de las células satélite contribuye de forma significativa al crecimiento muscular tras un entrenamiento a largo plazo (Favier et al. 2008; Hawke 2005).

Testosterona (T). A largo plazo, el entrenamiento de fuerza se ha asociado en algunos estudios (Ahtiainen et al. 2003; Gorostiaga et al. 2004), pero no en otros (Guadalupe-Grau et al. 2009) a un aumento sostenido de la concentración basal total de testosterona en plasma, aunque sin cambios en la concentración plasmática de la fracción libre de la hormona. La T ejerce sus efectos sobre la síntesis proteica en el músculo esquelético a través de los receptores de andrógenos (AR). La testosterona se une al AR y lo transforma en un factor de trascripción capaz de translocarse al núcleo y asociarse con el ADN para regular la expresión de determinados genes que poseen elementos de respuesta a andrógenos (ERA) en su región promotora. El bloqueo de este receptor atenúa la ganancia de proteínas musculares, lo cual muestra la importancia fisiológica de las interacciones testosterona-AR en la hipertrofia muscular (Inoue et al. 1994). Además, de forma similar a IGF-1, la T ejerce su influencia en el crecimiento muscular a través de las células satélite. Dosis suprafisiológicas de testosterona incrementan el número de células satélite de una forma dependiente de la dosis (Sinha-Hikim et al. 2003), promoviendo su activación (Herbst and Bhasin 2004). El aumento de la concentración plasmática de testosterona inducido por el entrenamiento de fuerza podría

facilitar la pérdida de grasa corporal al incrementar la sensibilidad de las células adiposas a los estímulos lipolíticos (Wabitsch et al. 1997).

Leptina. Por otro lado, los niveles de testosterona libre en plasma se relacionan directamente con la concentración plasmática de leptina (Luukkaa et al. 1998) e inversamente con la concentración plasmática del receptor soluble de leptina (Chan et al. 2002). Incluso se ha demostrado en humanos que concentraciones elevadas de testosterona deprimen la producción de leptina (Wabitsch et al. 1997). De esta forma, el entrenamiento de fuerza puede provocar cambios neuroendocrinos que pueden determinar una alteración en la concentración plasmática de leptina libre y por lo tanto en los efectos de esta hormona. Si aumenta la fracción libre de leptina cabría esperar una disminución del apetito y de la ingesta calórica (Cinaz et al. 2005), así como un aumento del metabolismo basal (Wauters et al. 2002), lo que podría explicar parte de los efectos beneficiosos del entrenamiento de fuerza.

En cambio, la deficiencia de leptina (o de los receptores celulares de leptina, diferentes del receptor soluble circulante), adiponectina y el aumento de interleuguina 6 (IL-6) se asocian a la obesidad (Thomas and Segal 2004). No obstante, se desconoce hoy en día si el entrenamiento de fuerza en adultos sanos induce cambios en la concentración de leptina libre. Tampoco se sabe si el entrenamiento de fuerza modifica la sensibilidad del músculo esquelético a la acción de la leptina (Kraemer et al. 2002a). Se desconoce si cambios en la concentración sanguínea de leptina provocan a su vez cambios en la expresión expresión proteica de OB-Rb en el músculo esquelético en seres humanos. Evidencias indirectas sugieren que OB-Rb está relacionado con la carga mecánica a la que se ve sometido el músculo esquelético. Tanto los ratones ob/ob como los db/db, poseen menor masa muscular que los ratones salvajes, a pesar de que la elevada masa corporal de los ratones db/db y ob/ob comparados con los ratones salvajes (Madiehe et al. 2002; Trostler et al. 1979). La administración de leptina incluso en camadas db/db promueve el crecimiento muscular, probablemente mediado por la isoforma corta OB-R (Madiehe et al. 2002). De la misma manera recientemente se ha demostrado que la administración de leptina a ratones ob/ob produce ganancia de masa muscular (Sainz et al. 2009). En teoría, un incremento en la expresión de OB-Rb en el músculo esquelético podría facilitar la hipertrofia muscular mediada por la vía de señalización de la leptina a través de JAK2/PIK3/Akt (Maroni et al. 2005).

3. Síntesis de proteínas: La respuesta final al estímulo generado por el entrenamiento de fuerza, la consecuente cascada de señalización y la diferenciación de las células satélite es el incremento de síntesis proteica. Aunque no está del todo definido, parece que existe una relación temporal entre los mecanismos de esta respuesta. Adams y col. (2002) sometieron el músculo plantar de ratas a 90 días de sobrecarga muscular y detallaron los mecanismos por los que se produjo la ganancia de proteínas. Inmediatamente (en el transcurso de un día) después del cese de la sobrecarga, la fosforilación de p70 S6K y elF4E aumentó aproximadamente 8 veces sobre los valores iniciales. Estos cambios en la eficiencia de la traducción volvieron a los valores iniciales entre 15 y 90 días después del cese de la carga. Por otro lado, el contenido de ADN siguió aumentando hasta el día 90 del protocolo, y el ARNm total del músculo que aumentó tras el tercer día, siguió aumentando hasta el día 7 y permaneció elevado hasta el día 90. Estos resultados indican que la eficiencia en la traducción (ARNm traducido por ribosoma) es importante para los cambios agudos en la síntesis proteica en las horas/días iniciales tras la sobrecarga, mientras que incrementar la capacidad transcripcional (cantidad de mionúcleos) a través de la fusión de las células satélite, y quizás una mayor capacidad de traducción (cantidad de ribosomas), regulan de forma crítica las ganancias de masa muscular a largo plazo.

4. <u>Hipertrofia de la fibra muscular</u>: la hipertrofia del músculo esquelético se define como un incremento en la masa muscular, la cual en los mamíferos adultos se produce como resultado del incremento en el tamaño, en oposición al número de las fibras musculares esqueléticas pre-existentes (Glass 2005). El mantenimiento de la masa muscular esquelética se estudia a menudo como el resultado neto del "balance" entre dos procesos diferentes, por un lado la síntesis proteica y por otro la degradación proteica. De cualquier forma, estos dos procesos bioquímicos no ocurren independientemente el uno del otro, sino que más bien son coordinados por una red intrínseca de señales (Nader 2005).

Para producir un incremento significativo de la síntesis de proteínas por parte del músculo son necesarias sesiones de entrenamiento seriadas y realizadas por un periodo de tiempo (por ejemplo, entrenamiento a largo plazo) (Kraemer et al. 2002b). La señalización "*upstream*" producida por la deformación mecánica de las fibras musculares, respuestas hormonales, cascadas de señalización y la actividad de las células satélite apoya esta adaptación. El crecimiento del músculo depende de la relación entre la síntesis y la

degradación de proteínas: solamente ocurre cuando la síntesis es mayor que la degradación. Aunque una sola sesión de entrenamiento de fuerza estimula tanto la síntesis como la degradación, el incremento desproporcionado en la síntesis proteica (si la alimentación es adecuada), favorece el crecimiento muscular (Spiering et al. 2008).

En cuanto a la hiperplasia (aumento en el número de fibras musculares), está demostrado en pájaros que son sometidos a ejercicio de forma crónica (Alway et al. 1990), sin embargo, no existen evidencias para el músculo humano adulto. Las principales adaptaciones en relación con el crecimiento del músculo en humanos tras un entrenamiento de fuerza son los siguientes: a) hipertrofia de las fibras musculares tipo I y II (aunque las fibras tipo II muestran una mayor capacidad para hipertrofiarse); b) aumento del área de sección transversal de los grupos musculares entrenados (medido por resonancia magnética); y c) no existe evidencia de hiperplasia (McCall et al. 1996).

4.1 <u>Actividad de las células satélite:</u> las fibras musculares son células multinucleadas que se forman a partir de la fusión de células precursoras llamadas mioblastos. Una vez finalizado el desarrollo embrionario, parte de las células precursoras permacen en la vecindad de las fibras musculares constituyendo un *pool* de células con capacidad de activarse y fusionarse con fibras musculares pre-existentes ó bien fusionarse entre si para originar una fibra muscular nueva. Estas células reciben el nombre de células satélite (Wozniak et al. 2005). Sobre las células satélite actúan una serie de factores de transcripción, como por ejemplo los factores de regulación miogénicos (MRFs), que comprenden la miogenina, MRF4, MyoD y MYf5 (Buckingham et al. 2003). Las células satélite se localizan en la periferia de las fibras esqueléticas maduras entre la lámina basal y el sarcolema y son responsables de las adaptaciones, crecimiento y reparación del músculo postnatal (Mauro 1961). Tienen habilidades pluripotenciales como son la capacidad de proliferar, fusionarse o diferenciarse (Zammit et al. 2004).

El conocimiento actual que existe sobre los factores que afectan a la biología de las células satélite comprende aspectos de especial interés como son la influencia de la estimulación mecánica, el envejecimiento y los factores endocrinos (Dhawan and Rando 2005; Sherwood and Wagers 2006; Wagers and Conboy 2005; Wozniak et al. 2005). *"In vivo*", las células satélite pueden ser activadas tras una sesión de ejercicio de alta intensidad (Crameri et al. 2004), aunque este estímulo es insuficiente para inducir a la diferenciación final. Aunque el

mecanismo no se conoce completamente, se ha observado "*in vitro*", que IGF-1 parece ejercer acciones proliferativas y retrasa el envejecimiento celular (Mouly et al. 2005). Además, la atrofia prolongada también produce una disfunción de las células satélite, aunque ésta es reversible (Mitchell and Pavlath 2004).

La teoría del dominio mionuclear propone que cada núcleo de una célula muscular multinucleada puede transcribir ARNm para un volumen determinado de citoplasma (Hawke 2005). En otras palabras, un núcleo sólo puede "estimular" una cantidad determinada de tejido muscular. Por tanto, para hipertrofiar una fibra muscular, se debe incrementar el número correspondiente de mionúcleos para regular el incremento del citoplasma. Esto se consigue incorporando las células satélites locales (y sus núcleos asociados) a la fibra muscular existente (Hawke 2005).

Las respuestas hormonales inducidas por el entrenamiento de fuerza, incrementan la actividad de las células satélite (activación, proliferación y diferenciación). Las hormonas y citoquinas activan estas células que normalmente se encuentran en estado quiescente, para consecuentemente proliferar, diferenciarse y fusionarse con las fibras musculares existentes. Esta respuesta de las células satélite tiene un papel muy importante, puesto que el incremento en el número de mionúcleos mejora la capacidad de la fibra para la transcripción, síntesis proteica y desarrollo de la misma (Toigo and Boutellier 2006). En este proceso tiene un papel crucial la interleuquina 6 (Serrano et al. 2008).

1.2.3 Principios del entrenamiento de fuerza y su relación con la señalización muscular.

El estudio adecuado de los mecanismos celulares y moleculares que inducen hipertrofia a través del entrenamiento de fuerza requiere que este estímulo sea adecuado. La efectividad y resultado de un entrenamiento para el desarrollo de la fuerza depende de la aplicación de una carga adecuada, es decir, de factores como la intensidad, volumen de entrenamiento (series x repeticiones), velocidad de ejecución, frecuencia y tipología de los ejercicios recomendados (isocinético/resistencia variable/isoinercial), periodos de recuperación entre las series, orden de los ejercicios y la frecuencia de entrenamiento (Izquierdo et al. 2009a).

 <u>Tipo y selección de los ejercicios</u>: la selección de los ejercicios determina los grupos musculares activados y el tipo de contracción muscular (concéntrica, excéntrica y/o isométrica). Normalmente los ejercicios se clasifican en función de si se emplean grandes o pequeños

51

grupos musculares. Los ejercicios que implican grandes grupos musculares (por ejemplo, pesos muertos, media sentadilla y levantamientos de tipo olímpico) promueven mayores respuestas metabólicas y hormonales que los ejercicios de pequeños grupos musculares (por ejemplo, curl de brazos, press de banca y press de hombro) (Ballor et al. 1987; Fahey et al. 1976; Nindl et al. 2003). Por tanto, utilizar ejercicios que impliquen grandes grupos musculares parece ser la mejor opción, puesto que promueve las mejores adaptaciones hormonales, y por consiguiente, las mejores adaptaciones al entrenamiento de fuerza, como se ha visto demostrado en la mejora de la traducción a través de la vía de señalización mTOR (Bush et al. 2003; Rommel et al. 2001), además de mejoras en la señalización de las células satélite (Favier et al. 2008; Hawke 2005), y ganancias de fuerza tras entrenamientos a largo plazo (Hansen et al. 2001; Kraemer and Ratamess 2005). Eliasson y col. (2006), demostraron que acciones musculares excéntricas máximas aumentan notablemente la fosforilación de p70 S6K, mientras que acciones musculares concéntricas máximas y excéntricas submáximas producen efectos menores. De acuerdo con este estudio, recientemente se ha publicado otra investigación que muestra una correlación entre el incremento de la fosforilación de p70 S6K y los incrementos de masa magra en el cuerpo entero y en las piernas, así como el 1RM en el ejercicio de media sentadilla y el área de sección transversal de las fibras tipo lla tras un entrenamiento de fuerza de 14 semanas, que consistía en ejercicios concéntricos que reclutaban grandes grupos musculares (media sentadilla, press de banca, curl de brazos, extensión de piernas, prensa inclinada, extensión de tríceps con polea, remo sentado, sit ups y extensiones de espalda) (Terzis et al. 2008). Por otro lado, Long y col. (2004) demostraron que las acciones excéntricas estimulan la vía de MAPK. Además, estudios realizados en animales muestran que las contracciones concéntricas, excéntricas e isométricas inducen respuestas similares en la señalización siempre y cuando la fuerza resultante sea similar (Garma et al. 2007). Sin embargo, el músculo esquelético es capaz de generar aproximadamente un 30% más de tensión durante las acciones excéntricas que durante las concéntricas, lo cual explica el por qué las contracciones excéntricas máximas promueven las mejores respuestas en la señalización de humanos (Eliasson et al. 2006) y animales (Baar and Esser 1999; Bolster et al. 2003).

En resumen, estos estudios indican que, cuando la tensión muscular es similar, las diferentes acciones musculares producen adaptaciones similares. Dentro de estas acciones musculares, las contracciones excéntricas parecen tener un estímulo más potente sobre las

vías de señalización, y esto es debido a que son capaces de generar una mayor tensión muscular. También ha de tenerse en cuenta que aunque estas acciones deben ser incluidas en los programas de entrenamiento, un exceso en el volumen podría ser contraproducente debido al daño muscular que pueden ocasionar (Yu et al. 2002).

2. Elección de las cargas: la carga representa la cantidad de peso levantado o la resistencia usada durante el ejercicio. La carga máxima que puede ser usada depende en gran medida de otras variables como es el volumen y el orden de los ejercicios, las acciones musculares y los intervalos de descanso (Gotshalk et al. 1997; Komi et al. 1987; Kraemer et al. 2002b; Willardson 2006, 2007). La carga se expresa normalmente como el porcentaje del 1 RM (por ejemplo, 85% 1RM) o el peso que permite realizar un número de repeticiones específicas (por ejemplo, 6RM). La carga y el volumen están relacionados de tal forma que si la carga aumenta el número de repeticiones disminuye. Por tanto, es difícil aislar los efectos debidos a la carga de los efectos debidos al volumen del entrenamiento. Dependiendo de las cargas aplicadas varían las adaptaciones producidas. De cualquier forma, para definir correctamente la intensidad, también sería importante conocer el número de repeticiones realizables, es decir, definir lo que se ha llamado, el carácter del esfuerzo para estas repeticiones/series. El carácter del esfuerzo, vendría definido por la relación entre las repeticiones por serie realizadas y las realizables (González Badillo and Ribas Serna 2002) Por ejemplo, cargas entre 1-6RM, 8-12RM y 15-25RM se recomiendan para mejorar la fuerza, producir hipertrofia y mejorar la resistencia muscular, respectivamente. Campos y col. (2002) evaluaron las adaptaciones tras 8 semanas de entrenamiento de fuerza progresivo en diferentes grupos, de forma que uno de ellos entrenó con cargas entre 3-5RM (repeticiones bajas), el segundo grupo entrenó con cargas entre 9 y 11RM (repeticiones intermedias) y el tercer grupo con cargas entre 20-28RM (repeticiones altas). El estudio reveló los siguientes resultados: mejoras progresivas en la fuerza muscular, siendo mayor en el grupo de bajas repeticiones que en los grupos de repeticiones intermedias y altas, siguiendo el patrón bajas > intermedias > altas; mejoras progresivas en la resistencia muscular (altas > intermedias > bajas); mejoras en el área de sección transversal del músculo (CSA) de las fibras musculares sólo en los grupos de repeticiones bajas e intermedias; y por último, mejoras en la potencia aeróbica máxima sólo en el grupo de repeticiones altas. Asimismo, tras 7 semanas de entrenamiento de fuerza utilizando la misma carga absoluta (kg) (5x10_{Rel}) y relativa (%)(5x10_{Abs}) las respuestas fueron superiores en términos de fatiga muscular (EMG), respuestas agudas hormonales (GH y FT) y de citoquinas (IL6, IL10) cuando la misma carga relativa fue utilizada (Izquierdo et al. 2009a; Izquierdo et al. 2009b). En un estudio de revisión publicado por Rhea y col. (2003) se concluye después de analizar 140 trabajos publicados en la literatura científica, que en personas no entrenadas, los mayores efectos sobre la fuerza se producen con una intensidad media del 60% de 1RM o aproximadamente 15RM. Sin embargo en personas entrenadas, una intensidad media de 80% u 8RM, parece ser la que produce más ganancias en el desarrollo de la fuerza. Esta diferencia puede estar relacionada con la capacidad del sistema neuromuscular de una persona entrenada de recuperarse, y sobre todo, con la necesidad de utilizar cargas más elevadas para conseguir nuevas adaptaciones. Por lo tanto, esto es indicativo de la necesidad de incrementar la carga progresivamente para mejorar el rendimiento (Izquierdo et al. 2006).

Estos resultados apoyan la noción de que los diferentes rangos de carga RM maximizan las adaptaciones musculares y endocrinas específicas. No existen estudios hasta la fecha que evalúen la influencia independiente de la carga del ejercicio sobre las respuestas en la señalización celular y sus subsecuentes adaptaciones al entrenamiento de fuerza.

El tipo de fibra muscular también puede influir en el efecto específico de la carga sobre las vías de señalización. Hay que tener en cuenta que los humanos poseen grupos musculares con diferentes proporciones de tipos de fibras, aunque el análisis de las proteínas implicadas en las vías de señalización requiere la homogeneización de la muestra muscular eliminando la posibilidad de analizar los resultados específicos de cada tipo de fibras. Este hecho es importante porque las cargas empleadas durante el entrenamiento de fuerza afectan al reclutamiento de unidades motoras (y por consiguiente, al tipo de fibra muscular), a no ser que los ejercicios sean realizados de forma explosiva o hasta la fatiga muscular (Spiering et al. 2008). Por lo tanto, el entrenamiento de fuerza con cargas bajas podría producir la estimulación de vías de señalización diferentes a las activadas cuando se emplean cargas altas. Este hecho se ha observado en los incrementos de la fosforilación p70 6SK principalmente en fibras tipo II tras la contracción muscular (Parkington et al. 2003).

3. <u>Volumen</u>: el volumen de ejercicio se expresa normalmente como: volumen = series (número) x repeticiones (número) x resistencia (peso) (Deschenes and Kraemer 2002). De este modo, se puede manipular el volumen de entrenamiento modificando el número de ejercicios realizados por sesión, el número de series realizadas por ejercicio, el número de repeticiones realizadas

por serie o la carga. Los cambios en el volumen de entrenamiento afectan en las respuestas hormonales (Kraemer and Ratamess 2005), neurales (Hakkinen et al. 1987) y metabólicas (Kraemer and Ratamess 2005) Gothsalk y col. (1997) demostraron que sesiones realizadas con varias series (volumen alto) de entrenamiento de fuerza provocan mayores respuestas en GH y T que aquellas realizadas con una sola serie (volumen bajo). Además, el entrenamiento a largo plazo que utiliza varias series comparado con aquellos que utilizan una única serie provoca mejores adaptaciones al entrenamiento de fuerza (Borst 2004). Izquierdo y col (2006) evaluaron los efectos del entrenamiento realizando series con repeticiones "hasta el fallo" o sin llegar a ello, y observaron que el entrenamiento sin llegar al fallo obtuvo mejores resultados en el desarrollo de la fuerza y la potencia, especialmente durante el periodo inmediato tras la intervención, mientras que realizar series hasta el fallo resultó en mejores ganancias de resistencia muscular local.

Al igual que ocurre con la carga de entrenamiento, es difícil describir los efectos independientes del volumen del entrenamiento de fuerza porque la mayoría de los experimentos manipulan la carga y el volumen simultáneamente. Sin embargo, alterar el volumen del entrenamiento puede modificar considerablemente la señalización muscular: El entrenamiento de fuerza con volúmenes altos podría agotar las reservas del glucógeno muscular, lo cual estimularía la actividad AMPK. Se sabe que la reducción de glucógeno muscular inducida por el ejercicio incrementa la actividad de AMPK (Churchley et al. 2007; Steinberg et al. 2006b), atenuando la señalización mediada por Akt y teóricamente produciendo resistencia a la síntesis proteica inducida por ejercicio (Creer et al. 2005).

Recientemente, McGee y col. (2001) (McGee et al. 2008) demostraron que tras someter a los músculos plantares tanto en ratones salvajes como en ratones LKB1(-/-) (carecen de la principal kinasa que actúa fosforilando y activando a la AMPK) a una sobrecarga durante 28 días, ambos logran el mismo grado de hipertrofia, además señalan que la isoforma α1 de AMPK es preferiblemente activada en el músculo esquelético en ausencia de adaptaciones metabólicas, sugiriendo que esta isoforma podría ser importante en la regulación del crecimiento, pero no del metabolismo.

En resumen, el conocimiento científico actual demuestra que es necesario adecuar el volumen de ejercicio para obtener las óptimas ganancias en fuerza e hipertrofia, pero aún se desconoce cuál es la relación entre el volumen y la señalización muscular ni su influencia en las adaptaciones musculares.

4. Periodos de descanso: los periodos de descanso entre series y ejercicios influencian significativamente las respuestas y adaptaciones al entrenamiento de fuerza. Periodos de descanso cortos se recomiendan en programas de entrenamiento de fuerza diseñados para maximizar la hipertrofia muscular, puesto que aumentan la respuesta de la GH cuando se compara con periodos de descanso largos (Kraemer et al. 1993; Kraemer et al. 1991; Kraemer et al. 1990; Willardson 2006). Sin embargo, los periodos de descanso cortos afectan a la condición física con la que se afrontan las siguientes series de ejercicios (Gotshalk et al. 1997), y tras varias semanas, atenúan los incrementos de fuerza cuando se comparan con los periodos de descanso largos. En relación con la señalización muscular, el periodo de descanso podría afectar en gran medida a la actividad AMPK. En teoría, los periodos cortos incrementan el stress metabólico asociado con el entrenamiento de fuerza, estimulando así la actividad AMPK e inhibiendo la síntesis de proteínas tras las sesiones de entrenamiento de fuerza. Esto podría explicar por qué los periodos cortos atenúan las ganancias en fuerza con el entrenamiento a largo plazo (Pincivero et al. 2006). Sin embargo, esta relación hipotética entre los periodos cortos, la actividad AMPK y la síntesis proteica es debatible por varias razones, primero porque no se ha estudiado el papel de la actividad AMPK mediando el crecimiento muscular tras el entrenamiento de fuerza y segundo porque los periodos cortos de descanso aumentan la respuesta de la GH al entrenamiento de fuerza, lo cual podría facilitar la hipertrofia muscular.

5. <u>Orden de los ejercicios:</u> la secuencia de ejercicios que se realizan en una sesión de entrenamiento afecta significativamente al rendimiento, la producción de fuerza y a la fatiga muscular (Kraemer et al. 2002b). Por ejemplo, realizar el ejercicio de media sentadilla al final de la sesión de entrenamiento, comparado con realizarlo al principio reduce en gran medida el número de repeticiones que pueden completarse (Spreuwenberg et al. 2006). Esto se explica por una atenuación en la activación muscular (medido por EMG), y por la fatiga metabólica (menores concentraciones de glucógeno y fosfocreatina) (Augustsson et al. 2003). El grado en el que el orden de los ejercicios influye en la magnitud de los cambios producidos por el entrenamiento de fuerza depende de las otras variables de los programas de ejercicio (volumen, descanso, cargas) para compensar el rendimiento neuromuscular alterado. En general, se recomienda emplear un entrenamiento progresivo enfatizando en los grandes grupos musculares con cargas medias a altas que oscilan entre 3-12RM, realizando varias

series para optimizar las ganancias en el tamaño del músculo (Kraemer et al. 2002b). Una rutina de entrenamiento como ésta recluta una gran cantidad de tejido muscular, incluyendo unidades motoras tipo II, y estimula las mayores respuestas hormonales.

6. <u>Frecuencia óptima:</u> la frecuencia óptima de entrenamiento (número de sesiones de entrenamiento a la semana) depende de varios factores, entre ellos, el volumen de carga, la intensidad, el nivel de condición física de los sujetos, la recuperación y el número de grupos musculares entrenados en cada sesión. Las recomendaciones del ACSM para las personas adultas se basan en las siguientes consideraciones: la frecuencia de entrenamiento debería estar en dos días/semana, la duración de la sesión estaría comprendida entre 30-60 minutos, se sugiere que lleven a cabo un programa de entrenamiento de levantamiento de pesos progresivo y/o bien de tipo calisténico. El entrenamiento consistiría en 8-10 ejercicios que incluyan los grandes grupos musculares con una intensidad de esfuerzo de entre 5-8 en una escala de 0-10 (Donnelly et al. 2009). En el estudio de revisión de Rhea y col. (2003) concluyeron que las personas no entrenadas tienen una dosis-respuesta que mejora con el número de días de entrenamiento de cada grupo muscular hasta alcanzar tres días/semana, sin embargo, en las personas entrenadas, se observa que dos días/semana (por grupo muscular) produce los mayores aumentos en la fuerza muscular.

7. <u>Velocidad de la acción muscular</u>: la velocidad de ejecución de las contracciones musculares afecta a las respuestas metabólicas, neurales y cardiovasculares. Esta variable tiene una relación directa con el reclutamiento de unidades motoras, pues incluso con cargas correspondientes al 30-40% del 1RM, todas las unidades motoras de un músculo se pueden reclutar si la velocidad de de ejecución es la máxima posible, tomando principal relevancia las fibras rápidas (González Badillo and Ribas Serna 2002).

De manera general se recomienda en personas no entrenadas se utilicen velocidades bajas (uno-dos segundos concéntrico/uno-dos segundos excéntrico) y moderadas (dos-tres segundos concéntrico/dos-tres segundos excéntrico). Cuando el objetivo del entrenamiento es la mejora de la potencia (caso particular de los miembros superiores de los tenistas), tanto el número de repeticiones/serie como el carácter del esfuerzo deberían mantenerse mientras la potencia no baje un porcentaje determinado. Por otra parte, la velocidad siempre será la máxima posible en todos los casos. En este sentido se ha observado que cuando se realizan repeticiones hasta el agotamiento con diferentes porcentajes de una repetición máxima (60%, 65%, 70% y 75% de 1RM) la curva de pérdida de la velocidad de ejecución), es similar entre las cargas (Izquierdo et al. 2006). Este resultado permite por primera vez conocer que independientemente de la intensidad que se utilice, la reducción de la velocidad comienza a ser significativa cuando se realiza el 30% del número posible de repeticiones realizables. Este umbral de velocidad, corresponde aproximadamente con un 89% de la velocidad máxima de ejecución que se puede realizar en las primeras repeticiones (Izquierdo et al. 2006).

1.2.4 Entrenamiento combinado de fuerza y resistencia.

El entrenamiento de fuerza y resistencia simultáneamente realizado se viene estudiando desde hace 30 años, ya entonces se observó que las adaptaciones de este tipo de entrenamiento se ven perjudicadas en comparación con realizar cada uno de estos entrenamientos por separado (Hickson 1980). Desde una perspectiva molecular, cualquier adaptación puede ser vista como una acumulación de proteínas específicas inducidas ante el estimulo de un ejercicio concreto (Hansen et al. 2005). Por una parte, y como hemos definido previamente la hipertrofia se produce cuando el ratio de síntesis proteica es mayor que el catabolismo de proteínas, resultando en un aumento de las proteínas musculares en el tiempo (Hawley 2009). Por otra parte, la resistencia es la habilidad de un individuo para realizar repetidas y continuas contracciones musculares durante periodos prolongados (<30 min) a una determinada potencia o velocidad submáxima (Hawley 2002). Recientemente se ha sugerido que el entrenamiento crónico de fuerza ó resistencia (<8 años), altera el patrón de de expresión génica; es decir, existen diferencias en el conjunto de genes que se alteran dependiendo del tipo de entrenamiento al que se someta el músculo esquelético humano (Stepto et al. 2009). Cuando integramos ejercicios de resistencia y fuerza dentro un mismo programa de entrenamiento, hemos de tener presente que ambos van a ocasionar diferentes tipos de respuestas de señalización en el músculo esquelético (Atherton et al. 2005). Éstos autores diseñaron dos protocolos de estimulación eléctrica en el músculo sóleo aislado de rata. Uno consistía en altas frecuencias y el otro en bajas frecuencias, mimetizando el ejercicio de fuerza y de resistencia respectivamente. El ejercicio de alta frecuencia produjo un aumento de la fosforilación de la cascada de señalización de AKt-mTOR. Sin embargo el ejercicio de baja frecuencia produjo un incremento de la fosforilación en la expresión proteica de AMPK y PGC-1. En ambos programas de entrenamiento se trato de una activación selectiva de las casadas de señalización, que sólo se explican como una respuesta adaptativa al ejercicio propuesto (Atherton et al. 2005). Posteriormente Coffey y col. (2006) en un intento de comprobar si se podían extrapolar estas conclusiones del modelo animal al músculo esquelético humano, diseñaron un estudio en el cual sometieron a una sesión de fuerza o de bicicleta a dos grupos de población, por un lado atletas entrenados en resistencia y por otro deportistas entrenados sólo en fuerza. En el grupo entrenado en fuerza hubo un incremento en la fosforilación de AMPK (54%), pero no se produjo un aumento en la fosforilación de AKT después de haber realizado la sesión de bicicleta. Sin embargo en los deportistas entrenados en resistencia no hubo ningún cambio significativo de AMPK, pero sí un aumento de AKT (50%). Por el contrario, después de una sesión de fuerza el grupo entrenado en resistencia aumentó en un 114% la fosforilación de AMPK, sin que el grupo de entrenado en fuerza experimentara ningún cambio (Coffey et al. 2006). Estos resultados no apoyan la hipótesis de una selección selectiva de las vías de señalización de AMPK-PGC1-AKT, en respuesta de estímulos diferentes; más bien indican un adaptación fenotípica en la sobrecarga ante un ejercicio y no del modelo de ejercicio per se (Hawley 2009). Coffey y col. (2009) comprobaron que la respuesta aguda ante una sesión de entrenamiento combinado de fuerza y resistencia no promueve el mismo grado de activación de las vías de señalización que se activan al realizar una sesión con un único objetivo de fuerza ó resistencia. Éste es un área de alto interés, pues las recomendaciones de las instituciones científicas (American Collage of Sports Medicine (ACSM) y American Herat Association (AHA)) propugnan el uso combinado de ejercicios de fuerza y resistencia con el objetivo de mejorar la salud. Además, muchos deportistas necesitan desarrollar tanto la fuerza como la velocidad de contracción muscular. No obstante, se desconoce en gran medida hasta qué punto las vías de señalización molecular se interfieren cuando se combinan ambos tipos de entrenamiento.



Figura 6. *Representación esquemática de las vías de señalización de mediadas por el ejercicio en programas de entrenamiento de fuerza y deresistencia.* Modificado de Hawley y col. (2009).

2. Hipótesis.

- El movimiento pliométrico que se efectúa en los golpeos técnicos del tenis, podría producir una hipertrofia selectiva en las fibras tipo II, y reducir el impacto de la reducción de las fibras IIx que se produce con la solicitación mecánica.
- La expresión de OB-R se incrementa en el tríceps dominante de tenistas profesionales, y/o la de SOCS3 y PTP1B se reduce, permitiendo el incremento de la señalización por leptina en este músculo.
- El entrenamiento de fuerza combinado con el de resistencia disminuye los niveles circulantes de leptina, promoviendo un aumento de la expresión proteica de OB-R en el músculo esquelético humano.
- El entrenamiento de resistencia podría bloquear la respuesta hipertrófica producida por un entrenamiento de fuerza, debido en parte a un incremento en la expresión proteica de SOCS3 en los músculos entrenados.
- El ejercicio de sprint de intensidad máxima y 30 segundos de duración actúa como un mimético de la leptina en el músculo esquelético humano, es decir activa la misma cascada de señalización que la leptina.
- La expresión de receptores de leptina es mayor en las fibras musculares de tipo I que en las de tipo II en músculo esquelético humano.

3. Objetivos.

- Describir los efectos de la participación en el tenis profesional, tanto en los volúmenes de las extremidades superiores, como en la composición de fibras del tríceps braquial y vasto lateral.
- Estudiar si la solicitación mecánica crónica altera la expresión de OB-R, tomando como modelo el tríceps braquial de tenistas profesionales, en comparación con el tríceps no dominante y el vasto lateral.
- Examinar los efectos de un entrenamiento combinado de fuerza y resistencia en la expresión proteica de OB-R.
- Determinar la distribución celular de los receptores de leptina a nivel proteico en el músculo esquelético sano de humanos.
- Comprobar si el ejercicio de esprint se comporta como un mimético de leptina en el músculo esquelético humano.

4. Metodología.

4.1 Sujetos.

Estudios I y II

Un total de 15 tenistas participaron en estos estudios. En el estudio 1, los tenistas fueron divididos en dos grupos: el grupo de biopsia muscular (7) y el de resonancia magnética nuclear (8). El estudio II, la muestra se amplió a 9 tenistas con biopsia muscular. Todos los sujetos tenían al menos 12 años de experiencia en entrenamiento de tenis y participaban en competiciones profesionales de la Federación Internacional de Tenis (Futures and Challengers tournaments). Los estudios se llevaron a cabo durante el torneo internacional de Maspalomas (Gran Canaria), que se realiza en Noviembre al final de temporada. Todos los tenistas estuvieron entrenando y compitiendo con normalidad y ninguno de ellos tuvo un periodo de inactividad durante los días previos a la realización de los test.

Estudio III

En este estudio participaron 17 policías reclutados entre el cuerpo de policía local de Las Palmas de Gran Canaria, Telde y San Bartolome de Tirajana. Todos los sujetos eran físicamente activos y estaban familiarizados con el entrenamiento de fuerza. El estado de salud de cada participante se estableció mediante historia médica y examen físico. Aquellos sujetos que estuvieron tomando algún tipo de medicación, padeciendo algún tipo de enfermedad crónica, tendinosa o hipertensión fueron excluidos de los estudios.

Estudio IV

En total 15 estudiantes universitarios físicamente activos participaron en este estudio. Estos fueron divididos en dos grupos el grupo control (7) y el grupo glucosa (8), que ingirió 75 gramos de glucosa 1 hora antes de efectuar el ejercicio de sprint (un test de Wingate).

4.2 Condición física.

Fuerza dinámica máxima (1RM).

La fuerza dinámica máxima fue medida usando el 1RM (1 repetición máxima, o peso máximo que sólo puede ser levantado una vez) en los ejercicios de los miembros inferiores: prensa inclinada (ILP), extensión de piernas unilateral (LE), media sentadilla (HS) y flexiones de piernas (LC) y para los miembro superiores: remo sentado (RS), press de banca (PB), extensión de tríceps en polea alta (TP). Los ejercicios se realizaron con un equipamiento de levantamiento de pesas (Technogym Ltd, Barcelona, España). Los sujetos fueron animados verbalmente a levantar la carga hasta la posición inicial en todos los ejercicios. Antes de realizar el test los sujetos calentaron durante 10 minutos pedaleando en un cicloergómetro (Monark 818E, Monark AB, Vargerg, Suecia). Tras el calentamiento realizaron 10 repeticiones con aproximadamente el 50% del 1RM estimado. Después hicieron levantamientos con cargas progresivamente más pesadas hasta determinar el 1 RM. Para evitar problemas de fatiga los sujetos descansaron entre 3 y 5 minutos entre cada una de las series. Con este procedimiento, en cinco intentos como máximo se alcanzó el 1 RM.

Potencia aeróbica máxima.

Para estimar el consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) se utilizó el test máximo de carrera de ida y vuelta de 20-m descrito por Leger y col. (1982). Se requería que los participantes corrieran entre dos líneas separadas 20 m, al ritmo de un pitido emitido por una cinta magnetofónica. La frecuencia de las señales sonoras se incrementaba de tal forma que la velocidad de carrera que comenzaba a 8.5 Km.h⁻¹ e iba aumentando en 0.5 Km.h⁻¹ cada minuto. El tiempo que los sujetos eran capaces de correr se registró y posteriormente se estimó el VO_{2max}. Este test ha mostrado una gran validez y reproducibilidad para la predicción del VO_{2max} (Leger et al. 1988).

Programa de entrenamiento de fuerza.

Objetivo: Mejora de la fuerza máxima y de la masa muscular.

Frecuencia: 3 días/semana

Calentamiento: 10[°] bicicleta a intensidad suave 2 series de 25 abdominales, 20 lumbares, 10 flexiones de brazos y estiramientos.

Parte Principal: La intensidad de trabajo viene determina a partir del 1RM, que es valorado cada 3 semanas para tener presentes las mejoras que se estén produciendo. La carga a levantar fue del 75% del 1RM. Los ejercicios y el orden para realizarlos fue el siguiente:

- 1. Media sentadilla en maquina multipower.
- 2. Press banca en banco plano.
- 3. Prensa inclinada.
- 4. Remo sentado en polea baja.
- 5. Extensión de piernas.
- 6. Tríceps en polea alta.
- 7. Flexión de piernas.

En el ejercicio de flexión de piernas, es el único en el que no se aumentan las series a lo largo de las semanas. Siempre se realizará 1 serie y será el último grupo muscular a trabajar.

A continuación de los ejercicios de musculación los sujetos realizaban la carrera continua a una intensidad establecida a partir de la frecuencia cardiaca de reserva (FCR) (Karvonen and Vuorimaa 1988).

Final de la sesión de entrenamiento: Los sujetos realizaron 2 series de 25 abdominales y estiramientos.

SEMANA	DIA	SERIES	REPETICIONES	REC	RESISTENCIA
	PRE (TF)	TF	TF	2′	
1	1	1	10	2′	20'(65%FCR)
	2	1	10	2′	20'(65%FCR)
	3	2	10	2′	20'(65%FCR)
2	1	2	10	2′	20'(65%FCR)
	2	2	10	2′	20'(65%FCR)
	3	3	10	2′	20'(65%FCR)
3	1	3	10	2′	25'(70%FCR)
	2	3	10	2′	25'(70%FCR)
	3	4	10	2′	25'(70%FCR)
4	TF 1	4	10		25'(70%FCR)
	2	4	10	2′	25'(70%FCR)
	3	4	10	2′	25'(70%FCR)
5	1	4	10	2′	30'(75%FCR)
	2	4	10	2′	30'(75%FCR)
	3	4	10	2′	30'(75%FCR)
6	1	4	10	2′	30'(75%FCR)
	2	4	10	2′	30'(75%FCR)
	3	4	10	2′	35'(75%FCR)
7	TF 1	4	10		35′(75%FCR)
	2	4	10	2′	35'(75%FCR)
	3	4	10	2′	35'(75%FCR)
8	1	4	10	2′	35'(75%FCR)
	2	4	10	2′	35´(75%FCR)
	3	4	10	2′	35'(75%FCR)
9	1	4	10	2′	35'(75%FCR)
	2	4	10	2′	35'(75%FCR)
	3	4	10	2′	35'(75%FCR)
10	TF 1	4	10		40' (75%FCR)
	2	4	10	2′	40' (75%FCR)
	3	4	10	2′	40' (75%FCR)
11	1	4	10	2′	40' (75%FCR)
	2	4	10	2′	40' (75%FCR)
	3	4	10	2′	40' (75%FCR)
12	1	4	10	2′	40'(80%FCR)
	2	4	10	2′	40'(80%FCR)
	3	4	10	2′	40'(80%FCR)
	POST (TF)	TF	TF		

Tabla 2. Programa de entrenamiento combinado de fuerza y resistencia.

Test de Fuerza (TF); Frecuencia cardiaca de reposo (FCR).

4.3 Composición corporal.

Antropometría.

La talla se midió en bipedestación con los talones, los glúteos la espalda y la región occipital en contacto con el plano del tallímetro. Estas medidas se efectuaron mediante un tallímetro de 1 mm de precisión (Atlántida, Añó Sayol, Barcelona, España), manteniendo la cabeza en el plano de Francfort. La masa corporal se midió mediante una báscula (Atlántida, Añó Sayol, Barcelona, España) de 50g de precisión, calibrada a 50.0, 70.0 ó 90.0 Kg, mediante masas patrón de la clase M1.

Masa muscular, masa ósea y porcentaje graso.

La masa magra (masa corporal – [masa grasa + masa ósea]) se determinó mediante absorciometría fotónica dual de rayos X (DXA) (QDR-1500, Hologic Corp., Software versión 7.10, Waltham, MA). Los sujetos se escanearon tumbados en posición supina junto a una barra de calibración de diferentes grosores y densidades. A partir del análisis regional y de cuerpo entero se calculó la masa magra (g), la masa grasa (g), el área ósea total (cm²) y el contenido mineral óseo (BMC) (g). La densidad mineral ósea superficial (BMD) se calculó siguiendo la fórmula BMD = BMC x área total⁻¹ (Guadalupe-Grau et al. 2009).

Volúmenes musculares.

Se determinó la sección transversal del músculo (CSA) y el volumen de los músculos del brazo mediante resonancia magnética nuclear (Philips Achieva 1.5, Tesla system, Philips Healthcare, Best, The Netherlands), para adquirir cortes contiguos de 10-mm de cada brazo independientemente, i.e., sin separación entre cortes. Las imágenes obtenidas se transfirieron a un ordenador para determinar la CSA mediante una reconstrucción digital (SliceOmatic 4.3, Tomovision Inc, Montreal) (Bancroft et al. 2007; Boles et al. 2000). Se calculó la distribución regional del volumen muscular en cada jugador de tenis, así como la fracción del volumen muscular total que le correspondía a cada músculo del brazo, en porcentaje (Holzbaur et al. 2007).

Biopsias musculares.

En los sujetos que lo autorizaron, se obtuvo una biopsia muscular por punción bajo anestesia local de la sección media del músculo vasto lateral, usando la técnica de Bergstrom (Bergstrom 1975). La muestra de tejido muscular fue inmediatamente montada e incluida en *Tissue-Tek* y congelada en isopentano enfriado con nitrógeno líquido, y guardada en un congelador de – 80°C hasta su análisis. El análisis de la cadena pesada de miosina (MHC) fue llevado a cabo en las biopsias musculares usando electroforesis desnaturalizante en geles de acrilamida con SDS (SDS-PAGE, Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Larsson et al. 2002).

De cada biopsia se obtuvieron de 20 a 40 secciones transversales (10 µm de grosor) mediante corte con un criotomo a -20°C (LEICA, CM1850, Alemania) y fueron sumergidas en 200-500 µL de tampón de lisis Laemmli (Laemmli 1970) (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 10% Glycerol, 2.3% SDS, 5% Mercaptoethanol) y calentadas durante 4 minutos a 95°C. Entre 2 y 12 µL de esta suspensión fueron cargados en los geles de electroforesis (SDS-PAGE) y sometidos a 70 V durante 44 horas a 4°C. Posteriormente, los geles fueron teñidos con Azul de Comassie (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead Hertfordshire, UK). La densidad óptica de las bandas de las isoformas de las cadenas pesadas de la miosina (MHC I, Ila IIx) fue determinada basándonos en los patrones de migración conocidos y cuantificados con el software de análisis de imagen Quantity One© (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead Hertfordshire, UK), tras el escaneo del gel en un densitómetro (Bio-Rad Laboratories, GS-800, Hemel Hempstead Hertfordshire, UK).

Para la determinación del resto de proteínas evaluadas (OB-R, SOCS3, PTP1B, STAT3, JAK2, ERK1/2, p38-MAPK, perilipina-A, α -tubulina), la obtención de los extractos proteicos se realizó tal como hemos descrito con anterioridad (Guerra et al. 2008; Guerra et al. 2007). Brevemente, después de homogenizar la muestra mecánicamente en buffer de Urea (Urea 6M y SDS 1%), los extractos se centrifugaron a 20.000g para eliminar los restos celulares, separando una alícuota para la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (Smith et al. 1985). Posteriormente se añadió a cada extracto β -mercaptoetanol (5%) y azul de bromofenol (0,0001%). Las proteínas resueltas mediante electroforesis fueron transferidas electroforéticamente a membranas de PVDF (*Hybond-P PVDF, Amersham*) y se procedió a la inmunodetección (Harlow and Lane 1988) utilizando para ello anticuerpos específicos para cada una de las proteínas en estudio. Para identificar las vías de señalización

intracelulares activadas a partir del receptor de leptina y determinar los cambios de actividad (fosforilación en residuos específicos de aminoácidos) de las quinasas de proteína implicadas en estas vías, se emplearon anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas y totales de las mismas. La visualización de los inmunomarcajes específicos obtenidos se realizó mediante quimioluminiscencia, empleando para ello anticuerpos secundarios específicos acoplados a la enzima peroxidasa de rábano. La visualización de la reacción inmunológica se llevó a cabo por la reacción enzimática de la peroxidasa con un compuesto que emite luz al oxidarse (*ECL+ Western Blottin Detection kyt*, Amersham Biosciences) impresionando así una película sensible expuesta en contacto con la membrana (*Hyperfilm ECL*, Amersham Biosciences). Las bandas específicas obtenidas fueron visualizadas con *Chemidoc XRS system (Bio-Rad Laboratories)*) y analizadas con un programa informático de análisis de imagen (*Quantity One*©, BIO-RAD).

4.4 Muestras de sangre.

Análisis de sangre y determinaciones hormonales.

Todos los sujetos incluidos en los estudios fueron sometidos a extracciones de sangre periférica anticoagulada en EDTA a primera hora de la mañana (entre las 7:00 y las 9:00 horas) en ayunas, al comienzo del experimento para todos los estudios y al final del experimento para el estudio III. Las muestras de sangre fueron centrifugadas durante 35 min a 5.000 rpm (Beckman, Allegra 25R, USA) y el suero obtenido fue separado y almacenado en un congelador de -80 °C hasta su análisis. La concentración de hormonas en suero se determinó por medio de la técnica ELISA (*Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay*). La cuantificación se realizó en un lector de microplacas (ELx800 Universal Microplate Reader, Bioteck Instruments). Los kits empleados fueron los siguientes en función de la hormona que era objeto de análisis: Linco Research (St. Charles, Missouri, USA) para leptina, Diagnostic Systems Laboratories (Webster, Tex., USA) para testosterona libre. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron, 2.6% y 3.7% para leptina, y 6.5% y 3.1% para testosterona libre y respectivamente.

El nivel de insulina sérica se midió con electroquimioluminiscencia (ECLIA), en un analizador modular E170 utilizando un kit de insulina (Roche/Hitachi, Indianapolis, USA). La glucosa en suero fue medida por el método de la hexoquinasa (Roche/Hitachi, 11876899216, Indianapolis, USA). El grado de resistencia a la insulina se estimó determinando el HOMA

(Matthews et al. 1985) El índice Homa se calculó como la concentración de insulina en ayuno (µU.mL⁻¹) x concentración de glucosa en ayuno (mmol.L⁻¹)/22.5.

4.5 Consentimientos y aprobación ética.

Previamente a la realización de las pruebas todos los sujetos fueron informados acerca de los procedimientos y objetivos del estudio, así como de los posibles riesgos y beneficios, tras lo cual firmaron la correspondiente autorización informada. Los estudios se desarrollaron de acuerdo a lo regulado para los estudios clínicos en la Declaración de Helsinki de 1975, y bajo la aprobación del comité ético u órganos competentes de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

4.6 Estadística.

Como estadísticos descriptivos se presentan los valores de la media y la desviación estándar (SD). La homogeneidad de las varianzas se evaluó mediante el test de *Levene*. La distribución normal fue comprobada con el test de *Kolmogorov-Smirnov*, cuando fue necesario, el análisis estadístico fue realizado con los datos transformados logarítmicamente. Los cambios entre el inicio y el final del estudio III se analizaron mediante la prueba *ANOVA* para medidas repetidas, evaluando también los cambios en función del tiempo, y del grupo en el que se encontraban los sujetos. Además, se examinó la existencia de relaciones lineales ente variables usando el test de correlación de Pearson y regresión lineal múltiple. El análisis estadístico se realizó con el paquete informático SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, versión 15.0). Se han asumido diferencias significativas para $P \le 0.05$.

5. Resultados.

En este apartado se resumen los resultados más relevantes, los cuales se describen detalladamente en las publicaciones que forman parte de esta tesis doctoral.

5.1 Resumen de resultados del artículo 1 (Sanchís-Moysí et al, 2009).

Sanchis-Moysi J, Idoate F, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Alayón S, Carreras A, Dorado C, Calbet JA. The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, fiber-type distribution and muscle strength. Scand J Med Sci Sports. 2009 Jul 6.

Las extremidades superiores en el tenista: volumen muscular, distribución del tipo de fibra y fuerza muscular.

No se hallaron diferencias en la distribución de las fibras en ambos tríceps braquiales (2/3 eran tipo 2 y 1/3 tipo 1). El tríceps braquial dominante (TBD) presentó un 15% (DXA) más de masa libre de grasa que el tríceps braquial no dominante (TBND). El tipo de fibras 1, 2a y 2x en el TBD mostraron un hipertrofia de un 20, 22 y 34 % respectivamente, en comparación con el TBND. El VL estaba compuesto por un 60% de fibras tipo 1. Los músculos deltoides, Tríceps braquial, flexores de los brazos y flexor del antebrazo del brazo dominante tenían una hipertrofia entre un 11-15% con respecto al brazo no dominante. Estos músculos representan una fracción similar del volumen muscular en ambas extremidades superiores. El volumen muscular del brazo dominante correlacionó con el 1RM en el ejercicio de polea de tríceps. Además la potencia máxima alcanzada en el salto vertical se relacionó con el área de sección transversal del músculo vasto lateral (VL).

5.2 Resumen de resultados del artículo 2 (Olmedillas et al. 2009).

Hugo Olmedillas, Joaquin Sanchis-Moysi, Teresa Fuentes, Amelia Guadalupe-Grau, Jesus G. Ponce-Gonzalez, David Morales-Alamo, Alfredo Santana, Cecilia Dorado, Jose A L Calbet and Borja Guerra. Muscle hypertrophy and increased expression of leptin receptors in the musculus triceps brachii of the dominant arm in professional tennis players. Eur J Appl Physiol (In Press).

Hipertrofia muscular e incremento de la expresión del receptor de leptina en el músculo tríceps braquial del brazo dominante en tenistas profesionales.

La expresión proteica de la isoforma larga (funcional) del receptor de leptina fue un 62% mayor en el TBD que en el TBND de los tenistas profesionales. Además, la expresión proteica de OB-Rb fue mayor en el TBD comparado con el VL (P < 0.05) y similar entre TBND y VL. El contenido de perilipina A fue similar en ambos brazos, indicando un grado similar de contaminación proteica proveniente de los adipocitos en las biopsias en ambos tríceps.

La expresión proteica de SOCS3 y PTP1B, al igual que la fosforilación de Tyr⁷⁰⁵-STAT3 fueron similares en ambos brazos. Sólo en el TBD se encontró una correlación inversa entre la expresión de OB-R170 y el contenido proteico de SOCS3. La expresión proteica de PTP1B correlacionó significativamente con OB-R170, OB-R128 y OB-R98 en el TBD y con OB-R98 en el TBND.

5.3 Resumen de resultados del artículo 3 (Olmedillas et al. 2009).

Hugo Olmedillas, Borja Guerra, Amelia Guadalupe-Grau, Alfredo Santana, Teresa Fuentes, Cecilia Dorado, José A Serrano-Sanchez, Jose A L Calbet. **Concurrent strength and endurance training, leptin receptors and SOCS3 protein expression in the human vastus lateralis**.

Entrenamiento combinado de fuerza y resistencia, expresión proteica del receptor de leptina y SOCS3 en el vasto lateral, en humanos.

La fuerza dinámica máxima en los ejercicios entrenados aumentó entre un 26 y 49 %. Este efecto fue en parte debido a la hipertrofia muscular, ya que la masa libre de grasa se incrementó en un 1.7% en el grupo de entrenamiento. No se observaron cambios en la masa muscular de las extremidades inferiores en ninguno de los dos grupos estudiados. La masa grasa total disminuyó en el grupo que entrenó en casi 2 kg. Además, el porcentaje de masa grasa disminuyó en piernas un (6%) y en el tronco un (7%) en el mencionado grupo.

Las concentraciones séricas de leptina permanecieron sin cambios en el grupo control mientras que se observó una reducción en el grupo entrenamiento. Cabe destacar que la concentración de leptina por kg de masa grasa se redujo en un 30% después del entrenamiento. No se produjeron cambios significativos en las concentraciones de testosterona libre en suero, en ninguno de los dos grupos. La expresión proteica de OBR-170 y SOCS3 fue similar en los grupos control y entrenamiento tras el periodo entrenamiento. En el grupo entrenamiento, no se encontró relación entre los niveles de OB-R170 y los cambios en la masa muscular de las piernas.

5.4 Resumen de resultados del artículo 4 (Guerra et al. 2009).

Borja Guerra, Hugo Olmedillas, Amelia Guadalupe-Grau, Jesús G. Ponce-González, David Morales-Alamo, Teresa Fuentes, Pedro De Pablos, Alfredo Santana, José A.L. Calbet. **Sprint** exercise is a leptin signalling mimetic in human skeletal muscle.

El ejercicio de sprint imita la señalización activada por leptina en el músculo esquelético humano.

La concentración de leptina en suero se elevó (3.7 veces) 1 hora después de la ingestión de glucosa, y antes de comenzar el ejercicio, los niveles de insulina fueron más elevados en el grupo con glucosa (GG) comparado con el grupo control (CG). Sin embargo, los niveles de concentración basales de glucosa permanecieron sin cambios 1 hora después de la ingestión de glucosa. Durante el periodo posterior al ejercicio, en el CG hubo un incremento en la concentración de glucosa mientras que el GG disminuyó. La ingestión de glucosa derivó en una reducción continua de la concentración de insulina en el GG, mientras que en el CG se incrementó a los 30 minutos posteriores al ejercicio. Por otra parte, la concentración de leptina disminuyó en respuesta al ejercicio en ambos grupos, siendo significativamente más pronunciada en el grupo que ingirió la glucosa.

Comparando con las condiciones previas al ejercicio, la fosforilación de Tyr⁷⁰⁵-STAT3 fue incrementada a los 30 min después del ejercicio de sprint. La fosforilación basal de Tyr⁷⁰⁵-STAT3 no se vio afectada después de 1h de la ingesta de glucosa. Pero, la ingestión de glucosa bloqueó el incremento de fosforilación de Tyr⁷⁰⁵-STAT3 detectada 30 min después del Wingate. La fosforilación de Thr²⁰²/Ty²⁰⁴-ERK1/2 en reposo se vio reducida una hora después de la ingestión de glucosa. Comparándolo con las condiciones previas al ejercicio, la fosforilación de Thr²⁰²/Ty²⁰⁴-ERK1/2 se incrementó 30 min después del ejercicio de sprint. La ingestión de glucosa redujo la fosforilación de Thr²⁰²/Ty²⁰⁴-ERK1/2 30 min después del test de Wingate.

La fosforilación basal de Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK se incrementó 2.5 veces 1 hora después de la ingestión de glucosa. Sin embargo, la fosforilación de Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK no se vio afectada después de la realización del test de Wingate en el grupo control. Aunque, se observó una reducción de la fosforilación de Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK 30 min después del ejercicio comparado con los niveles previos al ejercicio en el grupo que ingirió glucosa.
La expresión proteica en reposo de SOCS3 no cambió 1 hora después de la toma de glucosa. Comparado con las condiciones pre-ejercicio, la expresión de SOCS3 aumentó a los 120min después del ejercicio de sprint. Sin embargo, la ingestión de glucosa bloqueó el incremento de la expresión de SOCS3. No se observó ningún cambio significativo en la expresión proteica de PTP1B, en ninguno de los dos grupos.

En resumen, 30 minutos después del ejercicio de sprint los niveles de fosforilación de STAT3 y ERK se vieron aumentados. La expresión proteica de SOCS3 aumentó en los 120 minutos posteriores al ejercicio; sin embargo la expresión proteica de PTP1B no se vio afectada. La ingestión de glucosa anuló la fosforilación de STAT3 y ERK y el incremento a los 120 minutos de la expresión proteica de SOCS3. La activación de estas cascadas de señalización ocurrió a pesar de la disminución en la concentración de leptina después del sprint. Los niveles basales en la fosforilación de JAK2 y p38 MAPK se redujeron e incrementaron, respectivamente, por la glucosa ingerida antes del ejercicio. Sin embargo, los niveles de fosforilación de Jak2 y p38 MAPK aumentaron y disminuyeron, respectivamente, durante el periodo de recuperación, cuando el ejercicio es precedido por la ingestión de glucosa. Estos resultados indican que el ejercicio facilita la fosforilación de JAK2 cuando el nivel de éste se ve disminuido antes de la realización del p38 MAPK depende del nivel basal de éste antes del comienzo del ejercicio.

6. Discusión.

6.1 Las extremidades superiores en el tenista: volumen muscular, distribución del tipo de fibra y fuerza muscular.

La presente investigación demuestra que el tenis profesional provoca una magnitud relativa de hipertrofia idéntica en el m. deltoides, m. tríceps braquial, flexores de brazos y flexores superficiales del antebrazo. También cabe destacar que estos músculos representan una fracción similar de todo el volumen muscular de la extremidad superior en el brazo dominante y no dominante. Además, nuestros datos parecen indicar que los jugadores de tenis profesionales tienen una morfología muscular con predominancia de las fibras musculares 1 en el vasto lateral similar a la descrita en ciclistas (Horowitz et al. 1994; Rodriguez et al. 2002), aunque las propiedades mecánicas y metabólicas de las fibras tipo 1 pueden ser considerablemente diferentes en el mismo grupo muscular en diferentes atletas (Schiaffino and Reggiani 1996). Además, hemos observado que la participación en el tenis no está asociada a una diferencia en la composición de las fibras musculares en el tríceps braquial, ya que en ambos brazos encontramos una distribución similar en el tipo de fibras y en la composición de las MyHC. Este hallazgo fue inesperado ya que existen numerosos datos experimentales que demuestran que las fibras 2x se ven reducidas con el entrenamiento, habiendo además numerosos estudios que han puesto de manifiesto la limitada capacidad que tiene el entrenamiento de fuerza para cambiar el tipo de fibras musculares de lentas a rápidas (Andersen and Aagaard 2000; Jansson et al. 1990; Perez-Gomez et al. 2008). Estudios recientes han puesto de manifiesto que sólo la combinación del entrenamiento de fuerza con movimientos que combinen ciclos estiramiento-acortamiento y balísticos puede producir un incremento en la MyHC IIA y una disminución en las MyHC I, indicando el cambio de la composición de las MyHC de lentas a IIA y de IIX a IIA (Andersen and Aagaard 2000; Guadalupe-Grau et al. 2009; Liu et al. 2003; Perez-Gomez et al. 2008). Otro dato interesante es que esta combinación de entrenamiento parece atenuar la reducción en las MyHC IIX en el tríceps braquial, la cual normalmente ocurre con el entrenamiento de fuerza (Liu et al. 2003) y con otros tipos de entrenamiento (Terzis et al. 2006).

Una posible explicación a este fenómeno es que la esporádica solicitación del brazo contralateral que se produce en ciertos golpeos junto con la influencia de los ejercicios de condicionamiento físico, los cuales se suelen llevar a cabo de forma bilateral, podría ser suficiente para producir esta reducción en la MyHC IIX. Además, se ha demostrado que la

composición de MyHC IIX disminuye en una proporción similar, con un valor medio del 7%, tanto con un entrenamiento de fuerza a una intensidad baja (30% 1RM) como alta (60% 1RM), valores bastante cercanos al 5% observado en nuestros tenistas (Gjovaag and Dahl 2009). El entrenamiento de fuerza a intensidades tan bajas como (16% 1RM) es capaz de producir hipertrofia muscular (Holm et al. 2008). Aunque no disponemos de datos longitudinales, el hecho de que el CSA de las fibras musculares de tipo 2 fuera similar en el tríceps braquial no dominante y en el vasto lateral es compatible en un cierto grado de hipertrofia en el tríceps braquial no dominante. Además, el CSA de las fibras musculares tipo 2 del tríceps no dominante de nuestros tenistas fue similar al CSA observado en el m. tríceps braquial después de un programa de entrenamiento de fuerza (Gjøvaag and Dahl 2008).

Nuestros resultados están en la línea de otros estudios previos en los que se muestra una mayor masa muscular en el brazo dominante comparado con el no dominante en tenistas (10-20%) (Calbet et al. 1998; Ducher et al. 2005; Sanchís Moysi et al. 1998). El incremento de la masa muscular del brazo dominante y en particular de la hipertrofia relativa del m. tríceps braquial puede ser explicada solamente como consecuencia de la demanda mecánica a la que se somete este músculo, ya que los mismos factores genéticos, nutricionales y hormonales están actuando en el brazo contralateral, el cual tiene fibras musculares más pequeñas.

El área media de todas las fibras musculares fue un 25% más alto en el brazo dominante que en el no dominante. Como cabía esperar, las fibras tipo 2 mostraron un mayor grado de hipertrofia que las fibras tipo 1 (Aagaard et al. 2001; Costill et al. 1979; Gjovaag and Dahl 2008). Las diferencias de la masa muscular entre los brazos (12-15%) fue menor que la diferencia en el área de la sección transversal del músculo tríceps braquial (25%), lo cual nos sugiere la relativa importancia de este músculo en los tenistas. De hecho, nuestro estudio muestra que este músculo por sí solo corresponde a un ¼ de la masa muscular total del brazo. En las últimas tres décadas estudios realizados con cinematografía y electromiografía han revelado que el movimiento de extensión del codo, con la consecuente participación del tríceps braquial, ocurre en la mayoría de los golpes de tenis (Buckley and Kerwin 1988; Chow et al. 1999; Chow et al. 2007). Así, durante el servicio, el tríceps braquial contribuye a la aceleración de la raqueta previa al impacto con la pelota (Van Gheluwe B and M. 1986). En el golpe de derecha, el tríceps muestra una fuerte actividad durante el golpeo de la bola, lo cual ocurre para contrarrestar la contracción máxima del bíceps braquial y el supinador largo (Van Gheluwe B and M. 1986). Tanto el revés a una mano como a dos manos también requiere de

77

la activación del tríceps braquial, del mismo modo que la volea de derecha como de revés, siendo mayor su activación durante este último golpeo (Chow et al. 1999; Chow et al. 2007). De hecho, la magnitud de la hipertrofia de las fibras musculares de la cabeza lateral del tríceps braquial es más del doble del incremento de la media de la masa muscular del brazo, lo cual sugiere que esta región específica está sometida a una sobrecarga probablemente mayor que la soportada por otros músculos del brazo.

La distribución de las fibras musculares de la cabeza lateral del tríceps braquial del brazo dominante de los tenistas es similar a la descrita para la porción larga (en el brazo dominante) en estudiantes de educación física (Terzis et al. 2003), o en la porción lateral (brazo no dominante) en adultos jóvenes no entrenados (Gjovaag and Dahl 2008). Aunque la porción lateral del tríceps braquial está extraordinariamente hipertrofiada en el brazo dominante comparado con el no dominante, los niveles de asimetría en los músculos deltoides, flexores del brazo y flexores superficiales del antebrazo fueron bastante similares (11-15%) indicando que todos estos músculos son reclutados de una forma similar en las acciones del tenis.

En resumen, la participación en el tenis actual produce una hipertrofia muscular en el brazo dominante, de forma que el aumento de volumen muscular en el brazo dominante es proporcionado, es decir, cada músculo del brazo dominante ocupa la misma fracción del volumen total que en brazo contralateral. Sin embargo, los músculos del antebrazo muestran una mayor variabilidad entre los tenistas. A pesar de la gran cantidad de ejercicio desarrollado por el tríceps braquial del brazo dominante, la composición del tipo de fibras es similar a la encontrada en el brazo no dominante, estando principalmente compuesta por fibras tipo 2. Por el contrario, la morfología del vasto lateral es similar a la que se ha observado en ciclistas. Sin embargo, los tenistas con mayor hipertrofia de las fibras musculares del vasto lateral son capaces de alcanzar mayores alturas de vuelo en el salto vertical, ya que pueden generar una mayor fuerza y potencia en las extremidades inferiores.

6.2 Hipertrofia muscular e incremento de la expresión del receptor de leptina en el músculo tríceps braquial del brazo dominante en tenistas profesionales.

En este estudio se muestra como la carga muscular crónica que provoca hipertrofia muscular está asociada con un aumento de la expresión proteica muscular de la isoforma larga funcional del receptor de leptina (OB-Rb). Además, este estudio también demuestra que la fosforilación

basal de Tyr⁷⁰⁵-STAT3 se encuentra reducida en el tríceps no dominante comparado con el vasto lateral, indicando que los músculos menos solicitados pueden tener reducida la fosforilación basal de STAT3, lo cual es compatible con una regulación negativa de la señalización activada por leptina. Este estudio también muestra que la expresión proteica de SOCS3 y PTP1B es similar en los tres músculos analizados, lo cual podría indicar el pequeño efecto que los músculos ejercitados tienen en la expresión proteica basal de estas tres proteínas, al menos en humanos físicamente activos.

Nuestro estudio, al igual que investigaciones anteriores, demuestra que los niveles séricos de leptina no correlacionan con la expresión proteica de SOCS3 en el músculo vasto lateral (Guerra et al. 2008). Sin embargo, sí encontramos que los niveles séricos de leptina se asocian con la expresión proteica de SOCS3 en el tríceps braquial no dominante. Este fenómeno sugiere que otros factores dominan sobre la leptina para regular la expresión proteica de SOCS3 en el soccas e jercicio regular. Esto podría ser necesario, puesto que un incremento en la expresión proteica de SOCS3 podría limitar la síntesis proteica muscular (Leger et al. 2008). Cabe destacar, que las correlaciones descritas parecen ser diferentes en el tríceps dominante con respecto al no dominante pero también parecen serlo entre el tríceps dominante y el vasto lateral del cuadriceps, también sometido a ejercicio regular, lo que sugiere que este sistema de transmisión de señales al interior celular se ve afectado por el ejercicio dependiendo del tipo de fibra muscular.

Se conoce muy poco sobre la regulación de la expresión de los receptores de leptina en el músculo esquelético de humanos. Leptina, insulina y el factor de crecimiento parecido a insulina de tipo 1 (*Insulin Like Growth* factor, IGF-1), testosterona y estradiol son los principales reguladores descritos de la expresión de OBR, pero también se sabe que los efectos de los niveles circulantes de hormonas sobre la expresión de OB-R muestran especificidad tisular (Alonso et al. 2007; Garofalo et al. 2004; Hikita et al. 2000; Ishikawa et al. 2007; Liu et al. 2007). Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de leptina a cultivos de células hepáticas estimula la expresión de OB-R (Tang et al. 2009). La testosterona reduce la expresión de los receptores de leptina (OB-Rs) en las células de Leydig (Ishikawa et al. 2007) y que el estradiol incrementa la expresión proteica de OBR en el músculo esquelético de ratas (Alonso et al. 2007). De hecho, resultados aportados recientemente por nuestro grupo de investigación han demostrado que la expresión proteica muscular de OB-Rb es al menos el doble en mujeres que en hombres (Guerra et al. 2008). Sin embargo, nuestro grupo de

investigación también ha demostrado recientemente que la expresión proteica de OB-Rb está reducida en el músculo deltoides y vasto lateral de sujetos obesos comparados con sujetos sanos (Fuentes et al. 2009).

En este segundo estudio de esta tesis doctoral, observamos que, en el tríceps braquial dominante, existe una correlación positiva entre la expresión proteica de OB-Rb y los niveles séricos circulantes de leptina, la cual no se observó en los otros dos músculos estudiados. Por lo tanto, parece que la práctica regular de ejercicio produce un incremento de la expresión de OB-Rb cuando el ejercicio produce hipertrofia muscular, al menos en músculos con una gran proporción de fibras tipo 2, como es el tríceps braquial (Sanchis-Moysi et al. 2009).

También se ha sugerido que la expresión de OB-R podría estar regulada por el estrés oxidativo en cultivos de células hepáticas (Tang et al. 2009). Puesto que tanto el tríceps braquial como el vasto lateral del cuadriceps están sometidos a estrés oxidativo generado por el ejercicio, otros factores deben estar estimulando la expresión proteica de OB-Rb en el tríceps braquial dominante.

Otro posible mecanismo que podría regular positivamente la expresión proteica de OB-Rb es el proceso de hipertrofia muscular. Experimentos realizados en líneas celulares de cáncer de mama han demostrado que OB-Rb es capaz de interaccionar con IGF-1. Además, IGF-1 es capaz de inducir la fosforilación de OB-Rb a través de la proteína quinasa de IGR-IR, la cual es activada tras la unión de IGF-1 al receptor IGF-IR. Sin embargo, la leptina es incapaz de transmitir señales al interior celular a través del IGF-IR (Ozbay and Nahta 2008). La contracción y estiramiento muscular estimula la producción de IGF-I y II, los cuales estimulan la hipertrofia muscular a través de un mecanismo autocrino (Adams and McCue 1998; Goldspink 1999; Matheny et al. 2009). Puesto que IGF-I es capaz de estimular la expresión de OB-Rb en líneas celulares de cáncer de mama, no es descabellado pensar que al mismo tiempo sea capaz de estimular la expresión de OB-Rb en músculo esquelético. De cualquier forma, esta hipótesis debe ser testada experimentalmente.

Estudios previos (Sanchis-Moysi et al. 2009) han puesto de manifiesto que en el músculo tríceps braquial las fibras musculares predominantemente hipertrofiadas son las de tipo 2, mientras que en el músculo vasto lateral del cuadriceps son las de tipo 1. Este fenómeno podría indicar que el incremento de expresión de OB-Rb observado en el tríceps braquial dominante podría estar ocurriendo predominantemente en las fibras musculares de tipo 2.

80

En cuanto a la señalización activada a partir de OB-Rb, hay que tener en cuenta que STAT3 puede ser activada por numerosos factores además de por leptina (Stepkowski et al. 2008). Uno de estos factores es la interleucina 6 (IL-6). En este sentido, un estudio reciente ha demostrado que la IL-6 es necesaria para la hipertrofia muscular mediada por células satélites a través de un mecanismo molecular que depende de la fosforilación de STAT3 en el residuo de aminoácido Tyr705 (Serrano et al. 2008). Además, hay que tener en cuenta que la IL-6 es producida localmente en músculo esquelético en respuesta a la contracción (Hiscock et al. 2004; Steensberg et al. 2000) y alargamiento muscular (McKay et al. 2009) y también, en respuesta a estrés oxidativo (Fischer et al. 2004).

Los niveles basales de fosforilación de STAT3 observados en el tríceps braquial y en el vasto lateral fueron muy similares; sin embargo, si se observó una reducción en el tríceps braquial dominante en comparación con el vasto lateral del cuádriceps (la comparación entre los tríceps dominante y no dominante no alcanzó significación estadística debido a la gran variabilidad observada en el brazo dominante).

Las diferencias observadas en la fosforilación basal de STAT3 podrían ser explicadas por una producción local reducida de IL-6 en el tríceps no dominante y en el vasto lateral. El ejercicio induce la producción de IL-6 principalmente en las fibras tipo 2 (Hiscock et al. 2004; Steensberg et al. 2000). A pesar de que los sujetos que participaron en este estudio tuvieron un proporción similar de fibras tipo 2 en ambos tríceps, y una menor proporción de éstas en el vasto lateral (Sanchis-Moysi et al. 2009), la fosforilación basal de STAT3 observada fue similar en los 3 músculos estudiados. Estos resultados sugieren que la fosforilación basal de STAT3 está incrementada en el tríceps dominante independientemente de su composición en lo que se refiere al tipo de fibra muscular.

Otro aspecto muy interesante del presente estudio es que el mecanismo de feedback negativo activado por la leptina y mediado por SOCS3 parece estar activo en el tríceps no dominante, dada la correlación observada entre estas dos variables, pudiendo estar reducida la sensibilidad muscular a la hormona en este músculo con respecto al músculo dominante contralateral. Por el contrario, la señalización activada por leptina estaría facilitada por la expresión incrementada de OB-Rb y por el hecho de que la expresión proteica SOCS3 ni de PTP1B no esté incrementada en este músculo. Este fenómeno es el opuesto al observado en sujetos obesos en los se observa que la expresión basal de OB-Rb se encuentra reducida en

el músculo deltoides y en el vasto lateral, lo que a su vez sugiere una sensibilidad muscular a la leptina reducida (Fuentes et al. 2009).

Se desconoce cual es la función del incremento de expresión de OB-Rb en el músculo humano hipertrofiado. ¿Es posible que el OB-Rb, y por lo tanto la leptina, estén implicados en el fenómeno de la hipertrofia muscular inducida por el ejercicio? En los últimos años se han aportado diversas evidencias experimentales que apuntan en este sentido. Por ejemplo, se ha demostrado que tanto los ratones ob/ob, los cuales son incapaces de producir leptina, como los ratones db/db que carecen de receptores funcionales para la leptina, poseen una masa muscular significativamente menor con respecto a sus respectivos ratones salvajes, a pesar de que los primeros pesan aproximadamente el doble que los últimos (Madiehe et al. 2002; Trostler et al. 1979). La administración de leptina, incluso a los ratones db/db, produce hipertrofia muscular que parece estar mediada por las isoformas cortas del receptor (Madiehe et al. 2002). Del mismo modo, un estudio muy reciente demuestra que la administración de leptina incrementa la masa muscular en los ratones ob/ob (Sainz et al. 2009). Por lo tanto, nuestros resultados podrían indicar que la expresión proteica incrementada de OB-Rb en el tríceps dominante podría facilitar el crecimiento muscular a través de un mecanismo que estaría mediado por la cascada de señalización de JAK2/PI3K/Akt (Maroni et al. 2005), y que podría estar activado por la leptina ó por el IGF-1.

El incremento de expresión proteica de OB-Rb observado en el tríceps braquial dominante podría jugar otro potencial papel, que sería la de facilitar la señalización activada por la hormona para regular positivamente la oxidación de grasas para hacer frente a la gran demanda energética causada por la practica del tenis. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser investigada en futuros estudios.

En resumen, este estudio demuestra que la hipertrofia muscular observada en el tríceps braquial dominante de tenistas profesionales se ve acompañada de una regulación positiva de la expresión proteica de la isoforma funcional del receptor de leptina. Este hallazgo podría ser compatible con un potencial papel de la señalización activada por esta hormona en el fenómeno de la hipertrofia muscular en sujetos humanos sanos. Puesto que la hipertrofia ocurre predominantemente en las fibras tipo 2 del tríceps y en las fibras tipo 1 del vasto lateral, nuestros resultados son compatibles con un incremento predominante de la expresión proteica de OB-Rb en las fibras tipo 2. Por otro lado, parece que la práctica regular de actividad física tiene un escaso o nulo efecto sobre la expresión proteica muscular de SOCS3 y PTP1B,

puesto que la expresión de estos dos reguladores negativos de la señalización activada por leptina fue muy similar en los diferentes músculos estudiados. Por el contrario, parece que el ejercicio sí que incrementa la fosforilación basal de STAT3 de manera muy similar en las fibras rápidas y lentas. Estos resultados son compatibles con un incremento de la sensibilidad a la leptina en el músculo hipertrofiado.

6.3 Entrenamiento combinado de fuerza y resistencia, expresión proteica del receptor de leptina y SOCS3 en el vasto lateral en humanos.

En este estudio, hemos investigado los efectos del entrenamiento de fuerza seguido de un entrenamiento de resistencia sobre la composición corporal, la leptina y la testosterona libre en suero, así como la expresión proteica de los receptores de leptina (OB-R) y de SOCS3 en el músculo vasto lateral del cuádriceps. El programa de entrenamiento resultó en un incremento de la fuerza muscular, el cual fue más marcado en los ejercicios de las extremidades superiores que en los de las extremidades inferiores. Además, el entrenamiento de fuerza produjo una hipertrofia muscular moderada en los músculos de la parte superior del cuerpo, mientras que ésta no se produjo ni en la masa libre de grasa de los miembros inferiores (determinada con DXA) ni en la sección transversal de las fibras musculares del vasto lateral. Por otra parte, hemos observado que este tipo de entrenamiento no produce cambios en el nivel basal de la expresión proteica de OB-Rb ni en SOCS3 en el músculo del vasto lateral en sujetos sanos. Por lo tanto, los resultados aportados por este estudio sugieren que el entrenamiento de fuerza no produce cambios en la expresión proteica muscular de OB-Rb en el vasto lateral del cuadriceps, incluso cuando produce una reducción de los niveles circulantes de leptina y una hipertrofia moderada de las fibras musculares de tipo 2.

Estudios previos han mostrado resultados contradictorios en lo que se refiere a los efectos de un programa de entrenamiento sobre los niveles séricos de leptina, pero en general la mayor parte de los estudios muestran una reducción de los niveles plasmáticos o séricos de la hormona cuando el programa de entrenamiento produce una reducción de la masa grasa (Kraemer et al. 2002a; Perusse et al. 1997). Se ha sugerido que los niveles de leptina pueden no solamente indicar la cantidad de tejido adiposo existente, sino que también podrían reflejar alteraciones en el balance energético (Hilton and Loucks 2000). La concentración sérica de leptina se ve dramáticamente reducida en condiciones de ayuno (Chan et al. 2002). Por ejemplo, se ha demostrado que en los niveles séricos de leptina se reducen en una situación

que produce un balance energético negativo incluso cuando estos niveles se ajustan por la masa grasa (Hukshorn et al. 2003). La reducción en la concentración de leptina por kg de masa grasa implica un sistema de retroalimentación capaz de influir en el equilibrio entre la producción de la hormona por parte del tejido adiposo y el aclaramiento de la leptina, produciendo que la concentración se mantenga a un nivel más bajo del esperado para la cantidad de tejido graso en caso de un balance negativo (Chan et al. 2002).

Nuestro programa de entrenamiento produjo una reducción significativa de la masa grasa, incluso aunque la ingesta calórica no fue controlada. Esta respuesta pudo ser facilitada por una estimulación de la respuesta lipolítica y de la oxidación de grasas durante el entrenamiento de resistencia cuando éste se realiza inmediatamente después de una sesión de entrenamiento de fuerza (Kang et al. 2009). Ya que la reducción de la masa grasa fue medida, hemos estimado que nuestros sujetos tuvieron un balance negativo de aproximadamente 200 kcal/día, siendo éste menor que el déficit de energía asociado con la reducción de la concentración de leptina después de una sesión de entrenamiento de resistencia (Zaccaria et al. 2002) ó de fuerza (Nindl et al. 2002). Nuestro estudio indica que este pequeño déficit es suficiente para alterar la relación normal entre la masa grasa y la concentración de leptina en suero de una forma similar a la observada en condiciones de ayuno (Chan et al. 2002). Se desconocen el mecanismo por los cuales el déficit de energía podría traducirse en una menor liberación de leptina por parte de los adipocitos, aunque podría estar relacionado con una reducción del tamaño de los adipocitos (Kohrt et al. 1996; Maffei et al. 1995). Puesto que la insulina estimula la liberación de leptina desde los adipocitos (Aas et al. 2009), otro potencial mecanismo que podría explicar este fenómeno podría ser la reducción observada en los niveles de insulina circulante, la cual acompaña al balance energético negativo.

Existen muy pocos estudios que hayan estudiado la señalización activada por leptina en músculo esquelético humano (Guerra et al. 2008; Guerra et al. 2007). Al respecto, un estudio reciente demuestra que un programa de entrenamiento de resistencia de 12 semanas de duración en roedores reduce la expresión de las isoformas largas y cortas del receptor hepático de leptina, produciéndose también una reducción de la masa grasa y de los niveles circulantes de leptina circulante (Yasari et al. (2009). También en roedores, 12 semanas de entrenamiento de resistencia reduce la expresión del ARNm de OB-Rb en la porción del núcleo arcuato del hipotálamo (Kimura et al. 2004) y en el tejido adiposo subcutáneo (Friedman et al.

1997). A diferencia de estos estudios, el presente estudio muestra que en humanos sanos, el entrenamiento de fuerza combinado con el de resistencia no produce cambios en la expresión de la isoforma funcional del receptor de leptina. Esto implica que la regulación de la expresión de los receptores de leptina en el músculo esquelético entrenado, particularmente cuando se produce hipertrofia, no esta únicamente determinada por los niveles circulantes de leptina, debiendo existir otros factores que modularían la expresión de los genes del receptor muscular de leptina. Al respecto, los resultados aportados por Benatti y col. (2008) demuestran que la expresión de OB-R no se ve reducida en el tejido adiposo de ratas que realizaron un entrenamiento de natación durante 9 semanas, a pesar de sí se redujo la masa grasa y la leptina circulante.

En humanos la expresión proteica de OB-R en el vasto lateral es casi el doble en mujeres que en hombres (Guerra et al. 2008). Sin embargo, también se sabe que la expresión proteica de OB-Rb esta reducida en el vasto lateral y en el deltoides de sujetos obesos en comparación con estos mismos músculos de sujetos controles no obesos (Fuentes et al. 2009). En el estudio II de esta tesis hemos observado que la expresión proteica de OB-Rb esta incrementada en el tríceps braquial dominante (hipertrofiado) de tenistas profesionales comparado con el tríceps contralateral (Olmedillas et al. 2009). Por lo tanto, la práctica regular de actividad física podría facilitar la expresión de la isoforma funcional del receptor de leptina sobre todo cuando se produce hipertrofia muscular, al menos en músculos ricos en fibras de tipo 2, como es el tríceps braquial (Olmedillas et al. 2009; Sanchis-Moysi et al. 2009). Sin embargo, a pesar de la hipertrofia observada en nuestro estudio en las fibras tipo 2a en respuesta al programa de entrenamiento, no se observaron cambios en el nivel de expresión muscular de OB-Rb. Hay varias posibles explicaciones para este hallazgo. En primer lugar, la magnitud de la hipertrofia muscular asociada al incremento de la expresión del receptor de leptina del tríceps braquial (estudio II) fue mucho mayor, además las fibras musculares tenían de media aproximadamente un 40% más CSA que lo observado en el vasto lateral de los sujetos de este estudio. Segundo, el programa de entrenamiento provocó una reducción de la leptina circulante por kg de masa grasa, lo cual podría haber contrarrestado el efecto del entrenamiento sobre la expresión del receptor de leptina. Por último, la realización del entrenamiento de resistencia inmediatamente después del entrenamiento de fuerza podría haber bloqueado los mecanismos normales de señalización activados por el entrenamiento de fuerza (Hawley 2009). Por ejemplo, nuestro programa de entrenamiento debió haber producido hipertrofia tanto en las fibras tipo 1 como en las tipo 2 (Campos et al. 2002; Putman et al. 2004), sin embargo, sólo se observó hipertrofia en las fibras tipo 2. Este hecho apoya nuestra hipótesis de que la realización de una sesión moderada de entrenamiento de resistencia inmediatamente después de una sesión de entrenamiento de fuerza bloquea la hipertrofia esperada de las fibras tipo 1. Un hallazgo muy similar fue encontrado por Putman y col. (2004) cuyos sujetos realizaron sesiones de entrenamiento de fuerza y resistencia en días alternos.

El entrenamiento de resistencia realizado después del entrenamiento de fuerza podría bloquear la señalización mediada por Akt/mTOR a través de la activación de la cascada AMPK/TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1 y 2) (Hawley 2009). En estudios realizados con roedores apuntan a que el entrenamiento de resistencia podría aumentar la expresión de SOCS3 (Spangenburg et al. 2006). La expresión excesiva de SOCS3 podría limitar la respuesta hipertrófica que se debería producir en respuesta al entrenamiento de fuerza (Greenhalgh and Alexander 2004; Lieskovska et al. 2003), bloqueando el efecto estimulatorio de la hipertrofia inducido por IGF-1 (Adams and McCue 1998; Goldspink 1999) y por IL-6 (Serrano et al. 2008).

Estudios previos realizados con roedores han puesto de manifiesto que un programa de entrenamiento de resistencia puede incrementar la expresión de SOCS3 (Spangenburg et al. 2006). Sin embargo, los resultados aportados por nuestro estudio muestran que la expresión de SOCS3 no se ve afectada por el entrenamiento, de forma que parece que en sujetos humanos sanos no es necesario reducir la expresión de SOCS3 para garantizar la señalización mediada por la leptina (Bjorbaek et al. 2000), a pesar de la reducción observada en los niveles circulantes de la hormona. De hecho, existen evidencias experimentales que demuestran que el entrenamiento de resistencia es capaz de revertir, al menos parcialmente, la resistencia muscular a la leptina observada en roedores obesos a través de un mecanismo que no requiere de la reducción de los niveles de ARNm de SOCS3 (Steinberg et al. 2004b). El hecho de que no hayamos observado en nuestro estudio un incremento de la expresión proteica muscular de SOCS3 en el vasto lateral entrenado, excluye la posibilidad de que la nula respuesta hipertrófica observada en las fibras de tipo 1 fuera producida por un aumento de los niveles de SOCS3 en respuesta al entrenamiento conjunto de fuerza-resistencia.

En resumen, este trabajo muestra que un programa de entrenamiento que combina fuerza y resistencia reduce los niveles circulantes de leptina y la masa grasa, aunque la reducción de la concentraciones séricas de leptina es proporcionalmente mayor que la reducción de la masa grasa, resultando en un menor ratio leptina/masa grasa en el grupo que fue sometido a entrenamiento pero no en el grupo control. No se observaron cambios en la expresión proteica muscular de la isoforma larga funcional del receptor de leptina a pesar de la reducción observada en los niveles circulantes de su hormona. Este estudio demuestra, además, que este programa de entrenamiento combinado de fuerza-resistencia no altera la expresión proteica muscular de SOCS3. Por último, este estudio demuestra que la realización de las sesiones de resistencia inmediatamente después de las sesiones de fuerza bloquea la respuesta hipertrófica al entrenamiento de las fibras de tipo 1.

6.4 El ejercicio de sprint limita la señalización activada por leptina en el músculo esquelético humano.

En este estudio hemos examinado los cambios que se producen en la señalización por leptina en el músculo esquelético humano después de un ejercicio en sprint. Partiendo de la base de que la leptina y la insulina comparten algunas de las vías de señalización del músculo esquelético (Hekerman et al. 2005) y que la hiperinsulinemia inhibe la señalización de los receptores de leptina en células de fibroblastos humanos 293 (HEK celulas 293) (Kellerer et al. 2001), también hemos determinado la influencia de la ingestión que la glucosa tienen en la señalización de la leptina en respuesta al ejercicio en sprint.

Hemos constatado que un ejercicio "all out" de 30 segundos en cicloergómetro realizado en condiciones de ayuno, estimula la fosforilación de STAT3, la cascada de señalización de ERK, ambas activadas por la leptina (Bjorbaek and Kahn 2004; Myers et al. 2008) y produce un incremento de SOCS3, también inducido por la leptina (Bjorbaek et al. 2000). De acuerdo con nuestra hipótesis, la ingestión de glucosa, probablemente a través de mantener elevada la insulina, atenúa la fosforilación de la expresión proteica de SOCS3. Estos resultados indican que la realización de un ejercicio en sprint en condiciones de ayuno, imita la señalización de la leptina en el músculo esquelético humano y que la ingestión por glucosa antes del ejercicio bloquea este efecto.

La vía de señalización JAK2/STAT3 es la principal cascada de señalización activada por leptina para regular el balance energético y controlar el peso corporal a través de los tejidos del sistema nervioso central y periférico, como es el músculo esquelético (Myers et al. 2008; Myers 2004). En el músculo esquelético humano, se observa una aumento en la fosforilación de JAK2 después de un ejercicio de intensidad moderada (30 min de bicicleta al 70% VO₂max) realizado en condiciones de ayuno (Consitt et al. 2008). Sin embargo, nosotros no hemos observado cambios significativos en la fosforilación de JAK2 inmediatamente después o durante el periodo de recuperación.

La administración de insulina en dosis fisiológicas produce la fosforilación de JAK2 en el músculo esquelético de rata (Saad et al. 1996). Sin embargo, en este estudio hemos observado que tras la ingestión de glucosa la fosforilación de JAK2 se reduce. La hiperinsulinemia inibe la señalización del receptor de leptina, debido a una reducción en el grado de fosforilación de JAK2 en células embrionarias de hígado humano (HEK 293), a través

de la via dependiente de la tirosin fosfatasa SHP-1 (Kellerer et al. 2001). A su vez, la reducción de la fosforilación de JAK2 puede bloquear la fosforilación de OB-R, y por consiguiente la señalización de leptina. Curiosamente, el ejercicio después de la ingestión de glucosa restaura los niveles basales de fosforilación de JAK2, indicando que el ejercicio actúa como un mimético de la leptina, incluso cuando la fosforilación de JAK2 estaba previamente reducida debido al incremento de los niveles de insulina.

Boonsong y col. (2007) no vieron cambios en la fosforilación de STAT3 en el músculo esquelético humano después de 4 horas de un clamp hiperinsulínico realizado 24 horas después de completar 90 minutos de ejercicio en bicicleta con una pierna a intensidad moderada (60% del Vo₂max). De acuerdo con estos datos, la ingestión de glucosa no modificó la fosforilación basal de STAT3 en nuestro estudio. Además, la ingestión de glucosa, 30 min después el ejercicio, bloqueó la fosforilación de STAT3 observada en el grupo control. Del mismo modo, la fosforilación de STAT3 aumentó 2 horas después de una sesión de ejercicio de fuerza (Trenerry et al. 2007; Trenerry et al. 2008). Sin embargo, la fosforilación de STAT3 permaneció sin cambios después de 90 minutos de ejercicio en bicicleta a una pierna, al 60% del Vo₂max (Boonsong et al. 2007).

En nuestro estudio la fosforilación de JAK2 se redujo por lo que también la fosforilación de ERK1/2 se vio reducida después de la ingestión de glucosa. Tanto los ejercicios de fuerza (Creer et al. 2005; Deldicque et al. 2008) como de resistencia pueden inducir la fosforilación de ERK1/2 (Aronson et al. 1998; Goodyear 2008; Yu et al. 2001). Los efectos de los ejercicios de resistencia (70% del VO₂max) aumentan con la duración del ejercicio hasta los 30 minutos, luego se estabiliza, y con el cese del ejercicio los valores de ERK regresan a niveles basales aproximadamente en 60 minutos (Widegren et al. 1998). Incluso a baja intensidad (35-40% del VO₂max) el ejercicio puede inducir la fosorilación ERK1/2, aunque esta respuesta es mucho más marcada al 75-80% del VO₂max (Richter et al. 2004; Widegren et al. 1998). A pesar de las altas tensiones alcanzadas durante el test de Wingate, no hemos observado ninguna fosforilación de ERK1/2 inmediatamente después del ejercicio. Sin embargo, esta respuesta se observó durante el periodo de recuperación, sugiriendo que la fosforilación de ERK1/2 es más dependiente de factores metabólicos que la tensión producida en el músculo.

La leptina puede inducir la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK) por medio de un mecanismo dependiente del óxido nitroso (Sharma et al. 2006). En concordancia, en nuestro estudio la ingesta de glucosa se acompañó de un

incremento de la leptina en suero y un incremento de la fosforilación de p38 en el músculo esquelético en reposo. La fosforilación de p38 MAPK también se puede lograr con ejercicos de fuerza (Deldicque et al. 2008; Karlsson et al. 2004) y de resistencia (Yu et al. 2003). En un estudio reciente Gibala y col. (2009) no encontraron cambios significativos en la fosforilación de p38MAPK inmediatamente después de un ejercicio de 30 segundos de sprint.

Aunque la administración de glucosa se acompañó por un pequeño incremento en la concentración de leptina, este efecto no fue suficiente para promover un incremento en la fosforilación de STAT3, por lo que a su vez, SOCS3 permaneció sin cambios. El aumento de la expresión de SOCS3 no parece estar mediado por el mecanismo dependiente de leptina/STAT3, ya que la fosforilación de STAT3 se elevó a los 120 y 240 minutos posteriores al ejercicio en el grupo que tomo glucosa, mientras que la expresión proteica de SOCS3 permaneció en niveles basales. Además el ejercicio puede inducir una elevación de SOCS3, por otros mecanismos como puede ser la elevación de IL-6 (Kiu et al. 2009), conociéndose que la ingestión de glucosa bloquea este mecanismo (Febbraio et al. 2003).

Es interesante destacar que la elevación de SOCS3 no se acompañó de un incremento en el HOMA, indicando que *"in vivo"* SOCS3 parece no jugar un papel determinante en la regulación de la sensibilidad a la insulina como ha sido sugerido por Spangenburg y col. (2006).

Aunque en el presente estudio no se observaron cambios significativos en la expresión proteica de PTP1B, un estudio previo mostró que en el músculo esquelético de roedores se produjo un incremento en los niveles de PTP1B debido a una dieta que inducía a la obesidad, un único ejercicio de resistencia redujo tanto el contenido proteico de PTP1B como su actividad (Ropelle et al. 2006).

En resumen, en este estudio sugerimos que el ejercicio de sprint realizado en ayunas imita la señalización de la leptina en el músculo esquelético humano, ya que el ejercicio es capaz de activar la misma cascada de señalización activada por la leptina, independientemente de la concentración de leptina en suero. Sin embargo, la ingestión de glucosa 1 hora antes del ejercicio de sprint bloquea parte de la respuesta provocada por el ejercicio, posiblemente debido a un incremento en la concentración de insulina, la cual contrarresta la señal de la leptina en cultivos celulares.

7. Conclusiones.

Las siguientes conclusiones se pueden extraer de los resultados de los estudios experimentales integrados en esta tesis doctoral:

- La participación en el tenis produce hipertrofia muscular en el brazo dominante, siendo el volumen muscular de los músculos hipertrofiados proporcionado, es decir, cada músculo del brazo dominante ocupa la misma fracción del volumen total que en brazo contralateral.
- La composición del tipo de fibras es similar en el tríceps braquial dominante y no dominante estando principalmente compuesta por fibras tipo 2.
- La hipertrofia del tríceps braquial se acompaña de un aumento en la expresión proteica de la isoforma funcional del receptor de leptina.
- 4. La expresión proteica de SOCS3 y PTP1B en el músculo esquelético es similar en los músculos analizados, sugiriendo que la solicitación mecánica tiene poca influencia en estos dos reguladores negativos de la señalización de la leptina en sujetos sanos.
- La solicitación mecánica incrementó la fosforilación de STAT3 tanto en músculos ricos en fibras lentas como en fibras rápidas. Estos resultados son compatibles con un incremento en la sensibilidad a la leptina en los músculos hipertrofiados.
- Doce semanas de entrenamiento combinado de fuerza y resistencia reduce la masa grasa y la concentración de leptina circulante, observándose un menor ratio de leptina/masa grasa después del entrenamiento.
- Doce semanas de entrenamiento combinado de fuerza y resistencia, no produce cambios en la expresión proteica muscular de la isoforma funcional del receptor de leptina.
- La sesión del entrenamiento de resistencia inmediatamente después de un entrenamiento de fuerza bloquea parte de la hipertrofia en las fibras tipo 1.
- El ejercicio de sprint activa las mismas cascadas de señalización que la leptina, independientemente de la concentración de leptina en suero.
- 10. La ingestión de glucosa 1 hora antes del ejercicio de sprint disminuye la repuesta de activación de la cascada de señalización por leptina, probablemente debido al incremento en la concentración plasmática de insulina observada tras la ingestión de glucosa.

8. Bibliografía.

- Aagaard P, Andersen JL, Dyhre-Poulsen P, Leffers AM, Wagner A, Magnusson SP, Halkjaer-Kristensen J, Simonsen EB (2001) A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture. J Physiol 534: 613-623
- Aas AM, Hanssen KF, Berg JP, Thorsby PM, Birkeland KI (2009) Insulin-stimulated increase in serum leptin levels precedes and correlates with weight gain during insulin therapy in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 94: 2900-2906
- Adams GR, Caiozzo VJ, Haddad F, Baldwin KM (2002) Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. Am J Physiol Cell Physiol 283: C1182-1195
- Adams GR, McCue SA (1998) Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. J Appl Physiol 84: 1716-1722
- Ahima RS, Flier JS (2000) Leptin. Annu Rev Physiol 62: 413-437
- Ahima RS, Osei SY (2004) Leptin signaling. Physiology & behavior 81: 223-241
- Ahtiainen JP, Pakarinen A, Alen M, Kraemer WJ, Hakkinen K (2003) Muscle hypertrophy, hormonal adaptations and strength development during strength training in strength-trained and untrained men. Eur J Appl Physiol 89: 555-563
- Akerman F, Lei ZM, Rao CV (2002) Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. Gynecol Endocrinol 16: 299-306
- Alonso A, Fernandez R, Moreno M, Ordonez P, Diaz F, Gonzalez C (2007) Leptin and Its Receptor Are Controlled by 17{beta}-Estradiol in Peripheral Tissues of Ovariectomized Rats. Exp Biol Med (Maywood) 232: 542-549
- Alway SE, Gonyea WJ, Davis ME (1990) Muscle fiber formation and fiber hypertrophy during the onset of stretch-overload. Am J Physiol 259: C92-102
- Alway SE, Grumbt WH, Gonyea WJ, Stray-Gundersen J (1989) Contrasts in muscle and myofibers of elite male and female bodybuilders. Journal of Applied Physiology 67: 24-31.
- Andersen JL, Aagaard P (2000) Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. Muscle Nerve 23: 1095-1104
- Andersen RE, Wadden TA, Bartlett SJ, Zemel B, Verde TJ, Franckowiak SC (1999) Effects of lifestyle activity vs structured aerobic exercise in obese women: a randomized trial. Jama 281: 335-340
- Aperghis M, Velloso CP, Hameed M, Brothwood T, Bradley L, Bouloux PM, Harridge SD, Goldspink G (2009) Serum IGF-I levels and IGF-I gene splicing in muscle of healthy young males receiving rhGH. Growth Horm IGF Res 19: 61-67
- Ara I, Perez-Gomez J, Vicente-Rodriguez G, Chavarren J, Dorado C, Calbet JA (2006) Serum free testosterone, leptin and soluble leptin receptor changes in a 6-week strength-training programme. The British journal of nutrition 96: 1053-1059

- Ara I, Vicente-Rodriguez G, Jimenez-Ramirez J, Dorado C, Serrano-Sanchez JA, Calbet JA (2004) Regular participation in sports is associated with enhanced physical fitness and lower fat mass in prepubertal boys. Int J Obes Relat Metab Disord 28: 1585-1593
- Ara Royo IV-R, G. Pérez Gómez, J. Dorado García, C. Calbet J.A.L. (2003a) Leptina y Composición Corporal. Archivos de Medicina del Deporte XX: 42-51
- Ara Royo IV-R, G. Pérez Gómez, J. Dorado García, C. Calbet J.A.L. (2003b) Leptina y Ejercicio Físico. Archivos de Medicina del Deporte XX: 135-142
- Aranceta J, Perez-Rodrigo C, Serra-Majem L, Ribas L, Quiles-Izquierdo J, Vioque J, Foz M (2001) Influence of sociodemographic factors in the prevalence of obesity in Spain. The SEEDO'97 Study. Eur J Clin Nutr 55: 430-435
- Aranceta J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, Tur Mari J, Mataix Verdu J, Llopis Gonzalez J, Tojo R, Foz Sala M (2003) [Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study]. Med Clin (Barc) 120: 608-612
- Argiles JM, Lopez-Soriano J, Almendro V, Busquets S, Lopez-Soriano FJ (2005) Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? Med Res Rev 25: 49-65
- Armstrong R (1988) Muscle fiber recruitment patterns and their metabolic correlates. Mac Millan, New york
- Aronson D, Wojtaszewski JF, Thorell A, Nygren J, Zangen D, Richter EA, Ljungqvist O, Fielding RA, Goodyear LJ (1998) Extracellular-regulated protein kinase cascades are activated in response to injury in human skeletal muscle. Am J Physiol 275: C555-561
- Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H (2005) 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 19: 786-788
- Augustsson J, Thomee R, Hornstedt P, Lindblom J, Karlsson J, Grimby G (2003) Effect of pre-exhaustion exercise on lower-extremity muscle activation during a leg press exercise. Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association 17: 411-416
- Baar K, Esser K (1999) Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. Am J Physiol 276: C120-127
- Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998) The stomach is a source of leptin. Nature 394: 790-793
- Bahrenberg G, Behrmann I, Barthel A, Hekerman P, Heinrich PC, Joost HG, Becker W (2002) Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. Molecular endocrinology (Baltimore, Md 16: 859-872
- Ball K, Owen N, Salmon J, Bauman A, Gore CJ (2001) Associations of physical activity with body weight and fat in men and women. Int J Obes Relat Metab Disord 25: 914-919
- Ballor DL, Becque MD, Katch VL (1987) Metabolic responses during hydraulic resistance exercise. Med Sci Sports Exerc 19: 363-367

- Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower BA, Hunter GR, Goodman A, McLafferty CL, Jr., Urban RJ (2001) Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E383-390
- Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ, Berquist TH, O'Connor MI (2007) Compartmental anatomy relevant to biopsy planning. Seminars in musculoskeletal radiology 11: 16-27
- Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM (2006) Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. Diabetes 55: 2277-2285
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. The Journal of biological chemistry 275: 14563-14572
- Banks WA (2004) The many lives of leptin. Peptides 25: 331-338
- Bar-Or O, Foreyt J, Bouchard C, Brownell KD, Dietz WH, Ravussin E, Salbe AD, Schwenger S, St Jeor S, Torun B (1998) Physical activity, genetic, and nutritional considerations in childhood weight management. Medicine and science in sports and exercise 30: 2-10
- Baratta M (2002) Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. Med Sci Monit 8: RA282-292
- Bassett DR, Schneider PL, Huntington GE (2004) Physical activity in an Old Order Amish community. Medicine and science in sports and exercise 36: 79-85
- Bates SH, Myers MG, Jr. (2003) The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. Trends Endocrinol Metab 14: 447-452
- Baumann G (1991) Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. Endocrine reviews 12: 424-449
- Benatti FB, Polacow VO, Ribeiro SM, Gualano B, Coelho DF, Rogeri PS, Costa AS, Lancha Junior AH (2008) Swimming training down-regulates plasma leptin levels, but not adipose tissue ob mRNA expression. Braz J Med Biol Res 41: 866-871
- Benomar Y, Roy AF, Aubourg A, Djiane J, Taouis M (2005) Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. The Biochemical journal 388: 929-939
- Bergstrom J (1975) Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation 35: 609-616
- Berti L, Gammeltoft S (1999) Leptin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells by activation of ERK2. Mol Cell Endocrinol 157: 121-130
- Birk JB, Wojtaszewski JF (2006) Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. The Journal of physiology 577: 1021-1032
- Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers MG, Jr., Flier JS (2001) Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. The Journal of biological chemistry 276: 4747-4755

- Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS (1999) The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. The Journal of biological chemistry 274: 30059-30065
- Bjorbaek C, Kahn BB (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. Recent Prog Horm Res 59: 305-331
- Bjorbaek C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG, Jr. (2000) SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. The Journal of biological chemistry 275: 40649-40657
- Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. The Journal of biological chemistry 272: 32686-32695
- Blair SN, Church TS (2004) The fitness, obesity, and health equation: is physical activity the common denominator? Jama 292: 1232-1234
- Blair SN, Jackson AS (2001) Physical fitness and activity as separate heart disease risk factors: a metaanalysis. Medicine and science in sports and exercise 33: 762-764
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nature cell biology 3: 1014-1019
- Boles CA, Kannam S, Cardwell AB (2000) The forearm: anatomy of muscle compartments and nerves. Ajr 174: 151-159
- Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS (2002) AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. The Journal of biological chemistry 277: 23977-23980
- Bolster DR, Jefferson LS, Kimball SR (2004) Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. Proc Nutr Soc 63: 351-356
- Bolster DR, Kubica N, Crozier SJ, Williamson DL, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS (2003) Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. J Physiol 553: 213-220
- Bond Brill J, Perry AC, Parker L, Robinson A, Burnett K (2002) Dose-response effect of walking exercise on weight loss. How much is enough? Int J Obes Relat Metab Disord 26: 1484-1493
- Boonsong T, Norton L, Chokkalingam K, Jewell K, Macdonald I, Bennett A, Tsintzas K (2007) Effect of exercise and insulin on SREBP-1c expression in human skeletal muscle: potential roles for the ERK1/2 and Akt signalling pathways. Biochem Soc Trans 35: 1310-1311
- Borg P, Kukkonen-Harjula K, Fogelholm M, Pasanen M (2002) Effects of walking or resistance training on weight loss maintenance in obese, middle-aged men: a randomized trial. Int J Obes Relat Metab Disord 26: 676-683
- Borodulin K, Laatikainen T, Lahti-Koski M, Lakka TA, Laukkanen R, Sarna S, Jousilahti P (2005) Associations between estimated aerobic fitness and cardiovascular risk factors in adults with different levels of abdominal obesity. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 12: 126-131

- Borst SE (2004) Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. Age and ageing 33: 548-555
- Bottinelli R, Pellegrino MA, Canepari M, Rossi R, Reggiani C (1999) Specific contributions of various muscle fibre types to human muscle performance: an in vitro study. J Electromyogr Kinesiol 9: 87-95
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? Archives of neurology 23: 369-379
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. J Anat 202: 59-68
- Buckley JP, Kerwin DG (1988) The role of the biceps and triceps brachii during tennis serving. Ergonomics 31: 1621-1629
- Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, Parisi JE, Lloyd RV (2000) The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. Neuroendocrinology 71: 187-195
- Bush JA, Kimball SR, O'Connor PM, Suryawan A, Orellana RA, Nguyen HV, Jefferson LS, Davis TA (2003) Translational control of protein synthesis in muscle and liver of growth hormone-treated pigs. Endocrinology 144: 1273-1283
- Calbet JA, Moysi JS, Dorado C, Rodriguez LP (1998) Bone mineral content and density in professional tennis players. Calcif Tissue Int 62: 491-496
- Campbell KL, Westerlind KC, Harber VJ, Bell GJ, Mackey JR, Courneya KS (2007) Effects of aerobic exercise training on estrogen metabolism in premenopausal women: a randomized controlled trial. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16: 731-739
- Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, Staron RS (2002) Muscular adaptations in response to three different resistancetraining regimens: specificity of repetition maximum training zones. European Journal of Applied Physiology 88: 50-60.
- Carroll PV, Drake WM, Maher KT, Metcalfe K, Shaw NJ, Dunger DB, Cheetham TD, Camacho-Hubner C, Savage MO, Monson JP (2004) Comparison of continuation or cessation of growth hormone (GH) therapy on body composition and metabolic status in adolescents with severe GH deficiency at completion of linear growth. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 89: 3890-3895
- Ceddia RB, William WN, Jr., Curi R (2001) The response of skeletal muscle to leptin. Front Biosci 6: D90-97
- Cinaz P, Bideci A, Camurdan MO, Guven A, Gonen S (2005) Leptin and soluble leptin receptor levels in obese children in fasting and satiety states. J Pediatr Endocrinol Metab 18: 303-307
- Coffey VG, Jemiolo B, Edge J, Garnham AP, Trappe SW, Hawley JA (2009) Effect of consecutive repeated sprint and resistance exercise bouts on acute adaptive responses in human skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 297: R1441-1451

- Coffey VG, Zhong Z, Shield A, Canny BJ, Chibalin AV, Zierath JR, Hawley JA (2006) Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. Faseb J 20: 190-192
- Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, Mombaerts P, Friedman JM (2001) Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. The Journal of clinical investigation 108: 1113-1121
- Coleman DL, Hummel KP (1973) The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. Diabetologia 9: 287-293
- Considine RV (1997) Leptin and obesity in humans. Eat Weight Disord 2: 61-66
- Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF (1996) The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. Diabetes 45: 992-994
- Consitt LA, Wideman L, Hickey MS, Morrison RF (2008) Phosphorylation of the JAK2-STAT5 pathway in response to acute aerobic exercise. Med Sci Sports Exerc 40: 1031-1038
- Cook WS, Unger RH (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B: a potential leptin resistance factor of obesity. Developmental cell 2: 385-387
- Cooper AR, Page A, Fox KR, Misson J (2000) Physical activity patterns in normal, overweight and obese individuals using minute-by-minute accelerometry. Eur J Clin Nutr 54: 887-894
- Costill DL, Coyle EF, Fink WF, Lesmes GR, Witzmann FA (1979) Adaptations in skeletal muscle following strength training. Journal of Applied Physiology 46: 96-99
- Crameri RM, Langberg H, Magnusson P, Jensen CH, Schroder HD, Olesen JL, Suetta C, Teisner B, Kjaer M (2004) Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. J Physiol 558: 333-340
- Creer A, Gallagher P, Slivka D, Jemiolo B, Fink W, Trappe S (2005) Influence of muscle glycogen availability on ERK1/2 and Akt signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. J Appl Physiol 99: 950-956
- Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS (2002) Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. Diabetes 51: 2105-2112
- Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, Kelley DE, Friedman-Einat M, Skibinski GA, McCrory MA, Szalai AJ, Zhao AZ (2006) Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. Nat Med 12: 425-432
- Chow JW, Carlton LG, Lim YT, Shim JH, Chae WS, Kuenster AF (1999) Muscle activation during the tennis volley. Med Sci Sports Exerc 31: 846-854
- Chow JW, Knudson DV, Tillman MD, Andrew DP (2007) Pre- and post-impact muscle activation in the tennis volley: effects of ball speed, ball size and side of the body. Br J Sports Med 41: 754-759

- Christ M, Iannello C, Iannello PG, Grimm W (2004) Effects of a weight reduction program with and without aerobic exercise in the metabolic syndrome. International journal of cardiology 97: 115-122
- Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. Science (New York, NY 271: 994-996
- Chua SC, Jr., Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL (1997) Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. Genomics 45: 264-270
- Churchley EG, Coffey VG, Pedersen DJ, Shield A, Carey KA, Cameron-Smith D, Hawley JA (2007) Influence of preexercise muscle glycogen content on transcriptional activity of metabolic and myogenic genes in well-trained humans. J Appl Physiol 102: 1604-1611
- Davis JN, Hodges VA, Gillham MB (2006) Physical activity compliance: differences between overweight/obese and normal-weight adults. Obesity (Silver Spring, Md 14: 2259-2265
- Deldicque L, Atherton P, Patel R, Theisen D, Nielens H, Rennie MJ, Francaux M (2008) Decrease in Akt/PKB signalling in human skeletal muscle by resistance exercise. Eur J Appl Physiol 104: 57-65
- Deschenes MR, Kraemer WJ (2002) Performance and physiologic adaptations to resistance training. Am J Phys Med Rehabil 81: S3-16
- Dhawan J, Rando TA (2005) Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. Trends Cell Biol 15: 666-673
- Donnelly JE, Blair SN, Jakicic JM, Manore MM, Rankin JW, Smith BK (2009) American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. Medicine and science in sports and exercise 41: 459-471
- Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB (2006) Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. The Journal of physiology 576: 613-624
- Droyvold WB, Holmen J, Midthjell K, Lydersen S (2004) BMI change and leisure time physical activity (LTPA): an 11-y follow-up study in apparently healthy men aged 20-69 y with normal weight at baseline. Int J Obes Relat Metab Disord 28: 410-417
- Ducher G, Jaffre C, Arlettaz A, Benhamou CL, Courteix D (2005) Effects of long-term tennis playing on the muscle-bone relationship in the dominant and nondominant forearms. Can J Appl Physiol 30: 3-17
- Dulloo AG, Stock MJ, Solinas G, Boss O, Montani JP, Seydoux J (2002) Leptin directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle. FEBS Lett 515: 109-113
- Dumortier M, Brandou F, Perez-Martin A, Fedou C, Mercier J, Brun JF (2003) Low intensity endurance exercise targeted for lipid oxidation improves body composition and insulin sensitivity in patients with the metabolic syndrome. Diabetes Metab 29: 509-518

- Dunn SL, Bjornholm M, Bates SH, Chen Z, Seifert M, Myers MG, Jr. (2005) Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. Molecular endocrinology (Baltimore, Md 19: 925-938)
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. Science (New York, NY 283: 1544-1548
- Eliasson J, Elfegoun T, Nilsson J, Kohnke R, Ekblom B, Blomstrand E (2006) Maximal lengthening contractions increase p70 S6 kinase phosphorylation in human skeletal muscle in the absence of nutritional supply. Am J Physiol Endocrinol Metab 291: E1197-1205
- Eyckerman S, Broekaert D, Verhee A, Vandekerckhove J, Tavernier J (2000) Identification of the Y985 and Y1077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor. FEBS Lett 486: 33-37
- Fahey TD, Rolph R, Moungmee P, Nagel J, Mortara S (1976) Serum testosterone, body composition, and strength of young adults. Med Sci Sports 8: 31-34
- Favier FB, Benoit H, Freyssenet D (2008) Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. Pflugers Arch 456: 587-600
- Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krustrup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK (2003) Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. J Physiol 549: 607-612
- Fenkci S, Sarsan A, Rota S, Ardic F (2006) Effects of resistance or aerobic exercises on metabolic parameters in obese women who are not on a diet. Advances in therapy 23: 404-413
- Fischer CP, Hiscock NJ, Penkowa M, Basu S, Vessby B, Kallner A, Sjoberg LB, Pedersen BK (2004) Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. Journal of Physiology 558: 633-645
- French SA, Harnack LJ, Toomey TL, Hannan PJ (2007) Association between body weight, physical activity and food choices among metropolitan transit workers. The international journal of behavioral nutrition and physical activity 4: 52
- Friedman JE, Ferrara CM, Aulak KS, Hatzoglou M, McCune SA, Park S, Sherman WM (1997) Exercise training down-regulates ob gene expression in the genetically obese SHHF/Mcc-fa(cp) rat. Horm Metab Res 29: 214-219
- Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395: 763-770
- Frosig C, Rose AJ, Treebak JT, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF (2007) Effects of endurance exercise training on insulin signalling in human skeletal muscle - Interactions at the level of PI3-K, Akt and AS160. Diabetes
- Frost RA, Lang CH (2007) Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass. J Appl Physiol 103: 378-387

Fruhbeck G (2001) A heliocentric view of leptin. Proc Nutr Soc 60: 301-318

- Fruhbeck G (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. The Biochemical journal 393: 7-20
- Fruhbeck G, Jebb SA, Prentice AM (1998) Leptin: physiology and pathophysiology. Clinical physiology (Oxford, England) 18: 399-419
- Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, Helge JW, Calbet JA, Guerra B (2009) Leptin receptor 170 KDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. Exp Physiol
- Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, Smith JT, Habinowski SA, Kaijser L, Mu J, Ljungqvist O, Birnbaum MJ, Witters LA, Thorell A, Goodyear LJ (2000) Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMPactivated protein kinase activity in human skeletal muscle. Biochemical and biophysical research communications 273: 1150-1155
- Gabriel DA, Kamen G, Frost G (2006) Neural adaptations to resistive exercise: mechanisms and recommendations for training practices. Sports medicine (Auckland, NZ 36: 133-149
- Garma T, Kobayashi C, Haddad F, Adams GR, Bodell PW, Baldwin KM (2007) Similar acute molecular responses to equivalent volumes of isometric, lengthening, or shortening mode resistance exercise. J Appl Physiol 102: 135-143
- Garofalo C, Sisci D, Surmacz E (2004) Leptin interferes with the effects of the antiestrogen ICI 182,780 in MCF-7 breast cancer cells. Clin Cancer Res 10: 6466-6475
- Ghilardi N, Skoda RC (1997) The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. Molecular endocrinology (Baltimore, Md 11: 393-399
- Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC (1996) Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 6231-6235
- Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M (2009) Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1{alpha} in human skeletal muscle. J Appl Physiol 106: 929-934
- Gjovaag TF, Dahl HA (2008) Effect of training with different intensities and volumes on muscle fibre enzyme activity and cross sectional area in the m. triceps brachii. Eur J Appl Physiol 103: 399-409
- Gjovaag TF, Dahl HA (2009) Effect of training with different mechanical loadings on MyHC and GLUT4 changes. Medicine and science in sports and exercise 41: 129-136
- Gjøvaag TF, Dahl HA (2008) Effect of training with different intensities and volumes on muscle fibre enzyme activity and cross sectional area in the m. triceps brachii. Eur J Appl Physiol 103: 399-409
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. Int J Biochem Cell Biol 37: 1974-1984
- Goldspink G (1999) Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. J Anat 194 (Pt 3): 323-334

- González Badillo JJ, Ribas Serna J (2002) bases de la programación del entrenamiento de fuerza. INDE publicaciones
- Goodyear LJ (2008) The exercise pill--too good to be true? N Engl J Med 359: 1842-1844
- Gorostiaga EM (2005) Adaptaciones generales del organismo a la actividad física. Cap 2 Apuntes módulo de fisiología aplicada al alto entrenamiento deportivo Máster en alto rendimiento deportivo Centro Olímpico de Estudios Superiores
- Gorostiaga EM, Izquierdo M, Ruesta M, Iribarren J, Gonzalez-Badillo JJ, Ibanez J (2004) Strength training effects on physical performance and serum hormones in young soccer players. Eur J Appl Physiol 91: 698-707
- Gotshalk LA, Loebel CC, Nindl BC, Putukian M, Sebastianelli WJ, Newton RU, Hakkinen K, Kraemer WJ (1997) Hormonal responses of multiset versus single-set heavy-resistance exercise protocols. Can J Appl Physiol 22: 244-255
- Greenhalgh CJ, Alexander WS (2004) Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. Growth Horm IGF Res 14: 200-206
- Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Chavarren J, Dorado C, Santana A, Serrano-Sanchez JA, Calbet JA (2009) Strength training combined with plyometric jumps in adults: sex differences in fat-bone axis adaptations. J Appl Physiol 106: 1100-1111
- Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, Calbet JA (2008) Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. PLoS ONE 3: e3466
- Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C, Calbet JA (2007) Leptin receptors in human skeletal muscle. J Appl Physiol 102: 1786-1792
- Gutierrez-Fisac JL, Lopez E, Banegas JR, Graciani A, Rodriguez-Artalejo F (2004) Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain. Obes Res 12: 710-715
- Gutierrez-Fisac JL, Regidor E, Banegas JR, Rodriguez Artalejo F (2005) [Prevalence of obesity in the Spanish adult population: 14 years of continuous increase]. Med Clin (Barc) 124: 196-197
- Hakansson ML, Meister B (1998) Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 68: 420-427
- Hakkinen K, Kauhanen H, Komi PV (1987) Aerobic, anaerobic, assistant exercise and weightlifting performance capacities in elite weightlifters. The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness 27: 240-246
- Hakkinen K, Pakarinen A, Kyrolainen H, Cheng S, Kim DH, Komi PV (1990) Neuromuscular adaptations and serum hormones in females during prolonged power training. Int J Sports Med 11: 91-98
- Hakkinen K, Pakarinen A, Newton RU, Kraemer WJ (1998) Acute hormone responses to heavy resistance lower and upper extremity exercise in young versus old men. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 77: 312-319

- Hameed M, Lange KH, Andersen JL, Schjerling P, Kjaer M, Harridge SD, Goldspink G (2004) The effect of recombinant human growth hormone and resistance training on IGF-I mRNA expression in the muscles of elderly men. The Journal of physiology 555: 231-240
- Hansen AK, Fischer CP, Plomgaard P, Andersen JL, Saltin B, Pedersen BK (2005) Skeletal muscle adaptation: training twice every second day vs. training once daily. Journal of Applied Physiology 98: 93-99
- Hansen S, Kvorning T, Kjaer M, Sjogaard G (2001) The effect of short-term strength training on human skeletal muscle: the importance of physiologically elevated hormone levels. Scand J Med Sci Sports 11: 347-354
- Harber MP, Gallagher PM, Trautmann J, Trappe SW (2002) Myosin heavy chain composition of single muscle fibers in male distance runners. Int J Sports Med 23: 484-488
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. The Journal of physiology 574: 7-15
- Harlow E, Lane D (1988) Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories, New York
- Harvey J, Ashford ML (2003) Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. Neuropharmacology 44: 845-854
- Hather BM, Tesch PA, Buchanan P, Dudley GA (1991) Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. Acta physiologica Scandinavica 143: 177-185
- Hawke TJ (2005) Muscle stem cells and exercise training. Exerc Sport Sci Rev 33: 63-68
- Hawley JA (2002) Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. Clinical and experimental pharmacology & physiology 29: 218-222
- Hawley JA (2009) Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? Appl Physiol Nutr Metab 34: 355-361
- Hawley JA, Zierath JR (2004) Integration of metabolic and mitogenic signal transduction in skeletal muscle. Exercise and sport sciences reviews 32: 4-8
- Hayes VY, Urban RJ, Jiang J, Marcell TJ, Helgeson K, Mauras N (2001) Recombinant human growth hormone and recombinant human insulin-like growth factor I diminish the catabolic effects of hypogonadism in man: metabolic and molecular effects. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 86: 2211-2219
- Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A (2004) Leptin-induced signal transduction pathways. Cell biology international 28: 159-169
- Hekerman P, Zeidler J, Bamberg-Lemper S, Knobelspies H, Lavens D, Tavernier J, Joost HG, Becker W (2005) Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. Febs J 272: 109-119
- Henneman E, Somjen G, Carpenter DO (1965) Functional Significance of Cell Size in Spinal Motoneurons. J Neurophysiol 28: 560-580

- Herbst KL, Bhasin S (2004) Testosterone action on skeletal muscle. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7: 271-277
- Hickson RC (1980) Interference of strength development by simultaneously training for strength and endurance. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 45: 255-263
- Hickson RC, Hidaka K, Foster C (1994) Skeletal muscle fiber type, resistance training, and strengthrelated performance. Medicine and science in sports and exercise 26: 593-598
- Hikita M, Bujo H, Hirayama S, Takahashi K, Morisaki N, Saito Y (2000) Differential regulation of leptin receptor expression by insulin and leptin in neuroblastoma cells. Biochem Biophys Res Commun 271: 703-709
- Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS (2002) Characterizaton of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. Endocrinology 143: 775-783
- Hilton LK, Loucks AB (2000) Low energy availability, not exercise stress, suppresses the diurnal rhythm of leptin in healthy young women. Am J Physiol Endocrinol Metab 278: E43-49
- Hiscock N, Chan MH, Bisucci T, Darby IA, Febbraio MA (2004) Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. Faseb J 18: 992-994
- Holm L, Reitelseder S, Pedersen TG, Doessing S, Petersen SG, Flyvbjerg A, Andersen JL, Aagaard P, Kjaer M (2008) Changes in muscle size and MHC composition in response to resistance exercise with heavy and light loading intensity. J Appl Physiol 105: 1454-1461
- Holzbaur KR, Murray WM, Gold GE, Delp SL (2007) Upper limb muscle volumes in adult subjects. Journal of biomechanics 40: 742-749
- Hornberger TA, Chu WK, Mak YW, Hsiung JW, Huang SA, Chien S (2006) The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 4741-4746
- Hornberger TA, Stuppard R, Conley KE, Fedele MJ, Fiorotto ML, Chin ER, Esser KA (2004) Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. The Biochemical journal 380: 795-804
- Horowitz JF, Sidossis LS, Coyle EF (1994) High efficiency of type I muscle fibers improves performance. Int J Sports Med 15: 152-157
- Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K (2008) Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. Molecular pharmacology 74: 1610-1619
- Houmard JA, Cox JH, MacLean PS, Barakat HA (2000) Effect of short-term exercise training on leptin and insulin action. Metabolism 49: 858-861
- Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE (2004) Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. N Engl J Med 351: 2694-2703

- Hukshorn CJ, Menheere PP, Westerterp-Plantenga MS, Saris WH (2003) The effect of pegylated human recombinant leptin (PEG-OB) on neuroendocrine adaptations to semi-starvation in overweight men. Eur J Endocrinol 148: 649-655
- Hunter GR, Bryan DR, Wetzstein CJ, Zuckerman PA, Bamman MM (2002) Resistance training and intraabdominal adipose tissue in older men and women. Medicine and science in sports and exercise 34: 1023-1028
- Hymer WC, Kraemer WJ, Nindl BC, Marx JO, Benson DE, Welsch JR, Mazzetti SA, Volek JS, Deaver DR (2001) Characteristics of circulating growth hormone in women after acute heavy resistance exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab 281: E878-887
- Ibanez J, Izquierdo M, Arguelles I, Forga L, Larrion JL, Garcia-Unciti M, Idoate F, Gorostiaga EM (2005) Twice-weekly progressive resistance training decreases abdominal fat and improves insulin sensitivity in older men with type 2 diabetes. Diabetes care 28: 662-667
- Ihle JN, Kerr IM (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. Trends Genet 11: 69-74
- Inoue K, Yamasaki S, Fushiki T, Okada Y, Sugimoto E (1994) Androgen receptor antagonist suppresses exercise-induced hypertrophy of skeletal muscle. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 69: 88-91
- Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M (2007) Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. Andrologia 39: 22-27
- Izquierdo M, Ibanez J, Calbet JA, Gonzalez-Izal M, Navarro-Amezqueta I, Granados C, Malanda A, Idoate F, Gonzalez-Badillo JJ, Hakkinen K, Kraemer WJ, Tirapu I, Gorostiaga EM (2009a) Neuromuscular fatigue after resistance training. Int J Sports Med 30: 614-623
- Izquierdo M, Ibanez J, Calbet JA, Navarro-Amezqueta I, Gonzalez-Izal M, Idoate F, Hakkinen K, Kraemer WJ, Palacios-Sarrasqueta M, Almar M, Gorostiaga EM (2009b) Cytokine and hormone responses to resistance training. Eur J Appl Physiol 107: 397-409
- Izquierdo M, Ibanez J, Gonzalez-Badillo JJ, Hakkinen K, Ratamess NA, Kraemer WJ, French DN, Eslava J, Altadill A, Asiain X, Gorostiaga EM (2006) Differential effects of strength training leading to failure versus not to failure on hormonal responses, strength, and muscle power gains. J Appl Physiol 100: 1647-1656
- Jakicic JM, Clark K, Coleman E, Donnelly JE, Foreyt J, Melanson E, Volek J, Volpe SL (2001) American College of Sports Medicine position stand. Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. Medicine and science in sports and exercise 33: 2145-2156
- Jansson E, Esbjornsson M, Holm I, Jacobs I (1990) Increase in the proportion of fast-twitch muscle fibres by sprint training in males. Acta physiologica Scandinavica 140: 359-363
- Jorgensen SB, Rose AJ (2008) How is AMPK activity regulated in skeletal muscles during exercise? Front Biosci 13: 5589-5604
- Kang J, Rashti SL, Tranchina CP, Ratamess NA, Faigenbaum AD, Hoffman JR (2009) Effect of preceding resistance exercise on metabolism during subsequent aerobic session. Eur J Appl Physiol 107: 43-50

- Karlsson HK, Nilsson PA, Nilsson J, Chibalin AV, Zierath JR, Blomstrand E (2004) Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab 287: E1-7
- Karvonen J, Vuorimaa T (1988) Heart rate and exercise intensity during sports activities. Practical application. Sports medicine (Auckland, NZ 5: 303-311
- Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR, Trevillyan JM (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. Mol Cell Endocrinol 195: 109-118
- Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Haring HU (1997) Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. Diabetologia 40: 1358-1362
- Kellerer M, Lammers R, Fritsche A, Strack V, Machicao F, Borboni P, Ullrich A, Haring HU (2001) Insulin inhibits leptin receptor signalling in HEK293 cells at the level of janus kinase-2: a potential mechanism for hyperinsulinaemia-associated leptin resistance. Diabetologia 44: 1125-1132
- Kelley GA, Kelley KS, Vu Tran Z (2005) Aerobic exercise, lipids and lipoproteins in overweight and obese adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. Int J Obes Relat Metab Disord 29: 881-893
- Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS, Kahn BB (2000) In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. Endocrinology 141: 2328-2339
- Kimura M, Tateishi N, Shiota T, Yoshie F, Yamauchi H, Suzuki M, Shibasaki T (2004) Long-term exercise down-regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. Neuroreport 15: 713-716
- Kirwan JP, del Aguila LF, Hernandez JM, Williamson DL, O'Gorman DJ, Lewis R, Krishnan RK (2000) Regular exercise enhances insulin activation of IRS-1-associated PI3-kinase in human skeletal muscle. J Appl Physiol 88: 797-803
- Kiu H, Greenhalgh CJ, Thaus A, Hilton DJ, Nicola NA, Alexander WS, Roberts AW (2009) Regulation of multiple cytokine signalling pathways by SOCS3 is independent of SOCS2. Growth Factors: 1
- Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1Bdeficient mice. Molecular and cellular biology 20: 5479-5489
- Klausen K, Andersen LB, Pelle I (1981) Adaptive changes in work capacity, skeletal muscle capillarization and enzyme levels during training and detraining. Acta physiologica Scandinavica 113: 9-16
- Klimcakova E, Polak J, Moro C, Hejnova J, Majercik M, Viguerie N, Berlan M, Langin D, Stich V (2006) Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 91: 5107-5112
- Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG, Jr. (2002) Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. The Journal of biological chemistry 277: 41547-41555

- Kohrt WM, Landt M, Birge SJ, Jr. (1996) Serum leptin levels are reduced in response to exercise training, but not hormone replacement therapy, in older women. J Clin Endocrinol Metab 81: 3980-3985
- Komi PV, Gollhofer A, Schmidtbleicher D, Frick U (1987) Interaction between man and shoe in running: considerations for a more comprehensive measurement approach. International Journal of Sports Medicine 8: 196-202
- Kraemer RR, Chu H, Castracane VD (2002a) Leptin and exercise. Exp Biol Med (Maywood) 227: 701-708
- Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, Fleck SJ, Franklin B, Fry AC, Hoffman JR, Newton RU, Potteiger J, Stone MH, Ratamess NA, Triplett-McBride T (2002b) American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. Medicine and Science in Sports and Exercise 34: 364-380
- Kraemer WJ, Fleck SJ, Dziados JE, Harman EA, Marchitelli LJ, Gordon SE, Mello R, Frykman PN, Koziris LP, Triplett NT (1993) Changes in hormonal concentrations after different heavyresistance exercise protocols in women. J Appl Physiol 75: 594-604
- Kraemer WJ, Gordon SE, Fleck SJ, Marchitelli LJ, Mello R, Dziados JE, Friedl K, Harman E, Maresh C, Fry AC (1991) Endogenous anabolic hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise in males and females. Int J Sports Med 12: 228-235
- Kraemer WJ, Marchitelli L, Gordon SE, Harman E, Dziados JE, Mello R, Frykman P, McCurry D, Fleck SJ (1990) Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. J Appl Physiol 69: 1442-1450
- Kraemer WJ, Nindl BC, Marx JO, Gotshalk LA, Bush JA, Welsch JR, Volek JS, Spiering BA, Maresh CM, Mastro AM, Hymer WC (2006) Chronic resistance training in women potentiates growth hormone in vivo bioactivity: characterization of molecular mass variants. Am J Physiol Endocrinol Metab 291: E1177-1187
- Kraemer WJ, Ratamess NA (2005) Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports medicine (Auckland, NZ 35: 339-361
- Kraemer WJ, Staron RS, Hagerman FC, Hikida RS, Fry AC, Gordon SE, Nindl BC, Gothshalk LA, Volek JS, Marx JO, Newton RU, Hakkinen K (1998) The effects of short-term resistance training on endocrine function in men and women. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 78: 69-76
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J (2001) Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. Biochemical and biophysical research communications 283: 982-988
- Larsson B, Andersen JL, Kadi F, Bjork J, Gerdle B (2002) Myosin heavy chain isoforms influence surface EMG parameters: a study of the trapezius muscle in cleaners with and without myalgia and in healthy teachers. Eur J Appl Physiol 87: 481-488
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature 379: 632-635

- Leger B, Derave W, De Bock K, Hespel P, Russell AP (2008) Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. Rejuvenation Res 11: 163-175B
- Leger LA, Lambert J (1982) A maximal multistage 20-m shuttle run test to predict VO2 max. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 49: 1-12
- Leger LA, Mercier D, Gadoury C, Lambert J (1988) The multistage 20 metre shuttle run test for aerobic fitness. Journal of sports sciences 6: 93-101
- Lemmer JT, Ivey FM, Ryan AS, Martel GF, Hurlbut DE, Metter JE, Fozard JL, Fleg JL, Hurley BF (2001) Effect of strength training on resting metabolic rate and physical activity: age and gender comparisons. Medicine and science in sports and exercise 33: 532-541
- Li C, Friedman JM (1999) Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 9677-9682
- Lieskovska J, Guo D, Derman E (2003) Growth impairment in IL-6-overexpressing transgenic mice is associated with induction of SOCS3 mRNA. Growth Horm IGF Res 13: 26-35
- Linnamo V, Bottas R, Komi PV (2000) Force and EMG power spectrum during and after eccentric and concentric fatigue. J Electromyogr Kinesiol 10: 293-300
- Liu Y, Schlumberger A, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM (2003) Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training. J Appl Physiol 94: 2282-2288
- Liu ZJ, Bian J, Liu J, Endoh A (2007) Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. Horm Metab Res 39: 489-494
- Lobstein T, Baur L, Uauy R (2004) Obesity in children and young people: a crisis in public health. Obes Rev 5 Suppl 1: 4-104
- Long YC, Widegren U, Zierath JR (2004) Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. Proc Nutr Soc 63: 227-232
- López Chicharro J, Fernandez Vaquero A (2006) Fisiología del Ejercicio. 5 Ed Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana
- Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, Lehtonen A, Tilvis R, Tuomilehto J, Koulu M, Huupponen R (1998) Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. J Clin Endocrinol Metab 83: 3243-3246
- Madiehe AM, Hebert S, Mitchell TD, Harris RB (2002) Strain-dependent stimulation of growth in leptintreated obese db/db mice. Endocrinology 143: 3875-3883
- Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM (1995) Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 6957-6960
- Malisoux L, Francaux M, Theisen D (2007) What do single-fiber studies tell us about exercise training? Medicine and science in sports and exercise 39: 1051-1060

- Maroni P, Bendinelli P, Piccoletti R (2003) Early intracellular events induced by in vivo leptin treatment in mouse skeletal muscle. Mol Cell Endocrinol 201: 109-121
- Maroni P, Bendinelli P, Piccoletti R (2005) Intracellular signal transduction pathways induced by leptin in C2C12 cells. Cell Biol Int 29: 542-550
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placentaderived hormone in humans. Nat Med 3: 1029-1033
- Matheny RW, Merritt E, Zannikos SV, Farrar RP, Adamo ML (2009) Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. Exp Biol Med (Maywood) 234: 164-170
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28: 412-419
- Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol 9: 493-495
- McArdle WD KF, Katch, VL. (2001) Exercise Physiology: energy, nutrition and human performance. 5 Ed Philadelphia: Linppincot William & Wilkins
- McCall GE, Byrnes WC, Dickinson A, Pattany PM, Fleck SJ (1996) Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. J Appl Physiol 81: 2004-2012
- McGee SL, Mustard KJ, Hardie DG, Baar K (2008) Normal hypertrophy accompanied by phosphoryation and activation of AMP-activated protein kinase alpha1 following overload in LKB1 knockout mice. The Journal of physiology 586: 1731-1741
- McKay BR, De Lisio M, Johnston AP, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G (2009) Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following musclelengthening contractions in humans. PLoS One 4: e6027
- Mehebik N, Jaubert AM, Sabourault D, Giudicelli Y, Ribiere C (2005) Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. American journal of physiology 289: C379-387
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB (2002) Leptin stimulates fattyacid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature 415: 339-343
- Mitchell PO, Pavlath GK (2004) Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. Am J Physiol Cell Physiol 287: C1753-1762
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. Endocrinology 140: 5995-5998
- Mouly V, Aamiri A, Bigot A, Cooper RN, Di Donna S, Furling D, Gidaro T, Jacquemin V, Mamchaoui K, Negroni E, Perie S, Renault V, Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS (2005) The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy. Acta Physiol Scand 184: 3-15

- Munzberg H, Myers MG, Jr. (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. Nat Neurosci 8: 566-570
- Muoio DM, Dohm GL, Tapscott EB, Coleman RA (1999b) Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice. The American journal of physiology 276: E913-921
- Muoio DM, Lynis Dohm G (2002) Peripheral metabolic actions of leptin. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 16: 653-666
- Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA (1999a) AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3phosphate acyltransferase is a novel target. The Biochemical journal 338 (Pt 3): 783-791
- Myers MG, Cowley MA, Munzberg H (2008) Mechanisms of leptin action and leptin resistance. Annu Rev Physiol 70: 537-556
- Myers MG, Jr. (2004) Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. Recent Prog Horm Res 59: 287-304
- Nader GA (2005) Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. Int J Biochem Cell Biol 37: 1985-1996
- Nindl BC (2007) Exercise modulation of growth hormone isoforms: current knowledge and future directions for the exercise endocrinologist. British journal of sports medicine 41: 346-348; discussion 348
- Nindl BC, Kraemer WJ, Arciero PJ, Samatallee N, Leone CD, Mayo MF, Hafeman DL (2002) Leptin concentrations experience a delayed reduction after resistance exercise in men. Med Sci Sports Exerc 34: 608-613
- Nindl BC, Kraemer WJ, Marx JO, Arciero PJ, Dohi K, Kellogg MD, Loomis GA (2001) Overnight responses of the circulating IGF-I system after acute, heavy-resistance exercise. J Appl Physiol 90: 1319-1326
- Nindl BC, Kraemer WJ, Marx JO, Tuckow AP, Hymer WC (2003) Growth hormone molecular heterogeneity and exercise. Exercise and sport sciences reviews 31: 161-166
- Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Jr., Schwartz MW (2001) Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. Nature 413: 794-795
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM (2006) Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. Jama 295: 1549-1555
- Olmedillas H, Sanchis-Moysi J, Fuentes T, Guadalupe-Grau A, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Santana A, Dorado C, Calbet JA, Guerra B (2009) Muscle hypertrophy and increased expression of leptin receptors in the musculus triceps brachii of the dominant arm in professional tennis players. Eur J Appl Physiol
- Olson TP, Dengel DR, Leon AS, Schmitz KH (2007) Changes in inflammatory biomarkers following oneyear of moderate resistance training in overweight women. International journal of obesity (2005) 31: 996-1003

- Ozbay T, Nahta R (2008) A novel unidirectional cross-talk from the insulin-like growth factor-I receptor to leptin receptor in human breast cancer cells. Mol Cancer Res 6: 1052-1058
- Parkington JD, Siebert AP, LeBrasseur NK, Fielding RA (2003) Differential activation of mTOR signaling by contractile activity in skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285: R1086-1090
- Pasman WJ, Westerterp-Plantenga MS, Saris WH (1998) The effect of exercise training on leptin levels in obese males. The American journal of physiology 274: E280-286
- Pehme A, Alev K, Kaasik P, Seene T (2004) Age-related changes in skeletal-muscle myosin heavy-chain composition: effect of mechanical loading. Journal of aging and physical activity 12: 29-44
- Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Royo IA, Vicente-Rodriguez G, Ortiz RA, Chavarren J, Calbet JA (2008) Effects of weight lifting training combined with plyometric exercises on physical fitness, body composition, and knee extension velocity during kicking in football. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme 33: 501-510
- Perusse L, Collier G, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Nadeau A, Zimmet PZ, Bouchard C (1997) Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. J Appl Physiol 83: 5-10
- Pincivero DM, Gandhi V, Timmons MK, Coelho AJ (2006) Quadriceps femoris electromyogram during concentric, isometric and eccentric phases of fatiguing dynamic knee extensions. Journal of biomechanics 39: 246-254
- Piwien-Pilipuk G, Huo JS, Schwartz J (2002) Growth hormone signal transduction. J Pediatr Endocrinol Metab 15: 771-786
- Polak J, Moro C, Klimcakova E, Hejnova J, Majercik M, Viguerie N, Langin D, Lafontan M, Stich V, Berlan M (2005) Dynamic strength training improves insulin sensitivity and functional balance between adrenergic alpha 2A and beta pathways in subcutaneous adipose tissue of obese subjects. Diabetologia 48: 2631-2640
- Potvin JR (1997) Effects of muscle kinematics on surface EMG amplitude and frequency during fatiguing dynamic contractions. J Appl Physiol 82: 144-151
- Putman CT, Xu X, Gillies E, MacLean IM, Bell GJ (2004) Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. Eur J Appl Physiol 92: 376-384
- Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA, Mark AL (2003) Intracellular mechanisms involved in leptin regulation of sympathetic outflow. Hypertension 41: 763-767
- Rankin JW, Goldman LP, Puglisi MJ, Nickols-Richardson SM, Earthman CP, Gwazdauskas FC (2004) Effect of post-exercise supplement consumption on adaptations to resistance training. J Am Coll Nutr 23: 322-330
- Rhea MR, Alvar BA, Burkett LN, Ball SD (2003) A meta-analysis to determine the dose response for strength development. Med Sci Sports Exerc 35: 456-464
- Ribeiro MM, Silva AG, Santos NS, Guazzelle I, Matos LN, Trombetta IC, Halpern A, Negrao CE, Villares SM (2005) Diet and exercise training restore blood pressure and vasodilatory responses during physiological maneuvers in obese children. Circulation 111: 1915-1923
- Richter EA, Vistisen B, Maarbjerg SJ, Sajan M, Farese RV, Kiens B (2004) Differential effect of bicycling exercise intensity on activity and phosphorylation of atypical protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase in skeletal muscle. J Physiol 560: 909-918
- Rimbert V, Boirie Y, Bedu M, Hocquette JF, Ritz P, Morio B (2004) Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity. Faseb J 18: 737-739
- Rodriguez Artalejo F, Lopez Garcia E, Gutierrez-Fisac JL, Banegas Banegas JR, Lafuente Urdinguio PJ, Dominguez Rojas V (2002) Changes in the prevalence of overweight and obesity and their risk factors in Spain, 1987-1997. Prev Med 34: 72-81
- Rodriguez LP, Lopez-Rego J, Calbet JA, Valero R, Varela E, Ponce J (2002) Effects of training status on fibers of the musculus vastus lateralis in professional road cyclists. American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation 81: 651-660
- Roepstorff C, Helge JW, Vistisen B, Kiens B (2004) Studies of plasma membrane fatty acid-binding protein and other lipid-binding proteins in human skeletal muscle. Proc Nutr Soc 63: 239-244
- Roepstorff C, Thiele M, Hillig T, Pilegaard H, Richter EA, Wojtaszewski JF, Kiens B (2006) Higher skeletal muscle alpha2AMPK activation and lower energy charge and fat oxidation in men than in women during submaximal exercise. The Journal of physiology 574: 125-138
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat Cell Biol 3: 1009-1013
- Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Picardi PK, Faria MC, Cintra DE, Fernandes MF, Flores MB, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB (2006) Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. J Physiol 577: 997-1007
- Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA (1996) Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. J Biol Chem 271: 22100-22104
- Sahu A (2003) Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. Front Neuroendocrinol 24: 225-253
- Sainz N, Rodriguez A, Catalan V, Becerril S, Ramirez B, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G (2009) Leptin administration favors muscle mass accretion by decreasing FoxO3a and increasing PGC-1alpha in ob/ob mice. PLoS One 4: e6808
- Sanchis-Moysi J, Idoate F, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Alayon S, Carreras A, Dorado C, Calbet JA (2009) The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, fiber-type distribution and muscle strength. Scand J Med Sci Sports
- Sanchís Moysi J, Dorado García C, Calbet JAL (1998) Regional body composition in professional tennis players. In: Lees A, Maynard I, Hughes M, Reilly T (eds) Science and Racket Sports II. E. & F.N. Spon, London, pp. 34-39

- Sartorelli V, Fulco M (2004) Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. Sci STKE 2004: re11
- Schiaffino S, Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. Journal of Applied Physiology 77: 493-501
- Schiaffino S, Reggiani C (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. Physiological Reviews 76: 371-423.
- Schmitz KH, Hannan PJ, Stovitz SD, Bryan CJ, Warren M, Jensen MD (2007) Strength training and adiposity in premenopausal women: strong, healthy, and empowered study. The American journal of clinical nutrition 86: 566-572
- Schmitz KH, Jacobs DR, Jr., Leon AS, Schreiner PJ, Sternfeld B (2000) Physical activity and body weight: associations over ten years in the CARDIA study. Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Int J Obes Relat Metab Disord 24: 1475-1487
- Schmitz KH, Jensen MD, Kugler KC, Jeffery RW, Leon AS (2003) Strength training for obesity prevention in midlife women. Int J Obes Relat Metab Disord 27: 326-333
- Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Perez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Pena Quintana L (2003) [Childhood and adolescent obesity in Spain. Results of the enKid study (1998-2000)]. Med Clin (Barc) 121: 725-732
- Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardi M, Munoz-Canoves P (2008) Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. Cell Metab 7: 33-44
- Serrano AL, Perez M, Lucia A, Chicharro JL, Quiroz-Rothe E, Rivero JL (2001) Immunolabelling, histochemistry and in situ hybridisation in human skeletal muscle fibres to detect myosin heavy chain expression at the protein and mRNA level. Journal of anatomy 199: 329-337
- Services. USdohaH (2000) Healthy People 2010. With understanding and Improving Health and Objectives for Improving Health. 2 vols.
- . US Goverment Printing Office 2nd ed.
- Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, Anania FA (2006) Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. Endocr Relat Cancer 13: 629-640
- Sherwood RI, Wagers AJ (2006) Harnessing the potential of myogenic satellite cells. Trends Mol Med 12: 189-192
- Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S (2003) Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. Am J Physiol Endocrinol Metab 285: E197-205
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150: 76-85
- Spangenburg EE, Brown DA, Johnson MS, Moore RL (2006) Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. J Physiol 572: 839-848

- Spiering BA, Kraemer WJ, Anderson JM, Armstrong LE, Nindl BC, Volek JS, Maresh CM (2008) Resistance exercise biology: manipulation of resistance exercise programme variables determines the responses of cellular and molecular signalling pathways. Sports Med 38: 527-540
- Spreuwenberg LP, Kraemer WJ, Spiering BA, Volek JS, Hatfield DL, Silvestre R, Vingren JL, Fragala MS, Hakkinen K, Newton RU, Maresh CM, Fleck SJ (2006) Influence of exercise order in a resistance-training exercise session. Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association 20: 141-144
- Staron RS, Pette D (1987) The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres. Rabbit soleus muscle. The Biochemical journal 243: 687-693
- Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B (2000) Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6 [In Process Citation]. Journal of Physiology 529 Pt 1: 237-242
- Stefanick ML (1993) Exercise and weight control. Exercise and sport sciences reviews 21: 363-396
- Steinberg GR, Dyck DJ (2000) Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to highfat diets. Am J Physiol Endocrinol Metab 279: E1374-1382
- Steinberg GR, Dyck DJ, Calles-Escandon J, Tandon NN, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A (2002) Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle. The Journal of biological chemistry 277: 8854-8860
- Steinberg GR, Jorgensen SB (2007) The AMP-Activated Protein Kinase: Role in Regulation of Skeletal Muscle Metabolism and Insulin Sensitivity. Mini reviews in medicinal chemistry 7: 519-526
- Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D, Kemp BE (2006a) The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 91: 3592-3597
- Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Gorgun CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE (2006b) Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. Cell Metab 4: 465-474
- Steinberg GR, Smith AC, Van Denderen BJ, Chen Z, Murthy S, Campbell DJ, Heigenhauser GJ, Dyck DJ, Kemp BE (2004a) AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 89: 4575-4580
- Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, Dyck DJ (2004b) Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 286: E57-63
- Stephens TJ, Chen ZP, Canny BJ, Michell BJ, Kemp BE, McConell GK (2002) Progressive increase in human skeletal muscle AMPKalpha2 activity and ACC phosphorylation during exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab 282: E688-694
- Stepkowski SM, Chen W, Ross JA, Nagy ZS, Kirken RA (2008) STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions. Transplantation 85: 1372-1377

- Stepto NK, Coffey VG, Carey AL, Ponnampalam AP, Canny BJ, Powell D, Hawley JA (2009) Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. Medicine and science in sports and exercise 41: 546-565
- Stewart KJ, Bacher AC, Turner KL, Fleg JL, Hees PS, Shapiro EP, Tayback M, Ouyang P (2005) Effect of exercise on blood pressure in older persons: a randomized controlled trial. Arch Intern Med 165: 756-762
- Sweeney G (2002) Leptin signalling. Cellular signalling 14: 655-663
- Taaffe DR, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR, Marcus R (1996) Lack of effect of recombinant human growth hormone (GH) on muscle morphology and GH-insulin-like growth factor expression in resistancetrained elderly men. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 81: 421-425
- Tanaka T, Hidaka S, Masuzaki H, Yasue S, Minokoshi Y, Ebihara K, Chusho H, Ogawa Y, Toyoda T, Sato K, Miyanaga F, Fujimoto M, Tomita T, Kusakabe T, Kobayashi N, Tanioka H, Hayashi T, Hosoda K, Yoshimatsu H, Sakata T, Nakao K (2005) Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. Diabetes 54: 2365-2374
- Tang Y, Zheng S, Chen A (2009) Curcumin eliminates leptin's effects on hepatic stellate cell activation via interrupting leptin signaling. Endocrinology 150: 3011-3020
- Tarpenning KM, Wiswell RA, Hawkins SA, Marcell TJ (2001) Influence of weight training exercise and modification of hormonal response on skeletal muscle growth. Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia 4: 431-446
- Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. The Journal of biological chemistry 272: 6093-6096
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell 83: 1263-1271
- Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Huhtaniemi I, Aguilar E (2001) Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptininduced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. The Journal of endocrinology 170: 413-423
- Terzis G, Georgiadis G, Stratakos G, Vogiatzis I, Kavouras S, Manta P, Mascher H, Blomstrand E (2008) Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. Eur J Appl Physiol 102: 145-152
- Terzis G, Georgiadis G, Vassiliadou E, Manta P (2003) Relationship between shot put performance and triceps brachii fiber type composition and power production. Eur J Appl Physiol 90: 10-15
- Terzis G, Stattin B, Holmberg HC (2006) Upper body training and the triceps brachii muscle of elite cross country skiers. Scandinavian journal of medicine & science in sports 16: 121-126
- Thomas GD, Segal SS (2004) Neural control of muscle blood flow during exercise. Journal of Applied Physiology 97: 731-738

- Toigo M, Boutellier U (2006) New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. Eur J Appl Physiol 97: 643-663
- Trappe SW, Trappe TA, Lee GA, Widrick JJ, Costill DL, Fitts RH (2001) Comparison of a space shuttle flight (STS-78) and bed rest on human muscle function. J Appl Physiol 91: 57-64
- Treebak JT, Birk JB, Rose AJ, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF (2007) AS160 phosphorylation is associated with activation of alpha2beta2gamma1- but not alpha2beta2gamma3-AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 292: E715-722
- Treebak JT, Wojtaszewski JF (2008) Role of 5'AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. International journal of obesity (2005) 32 Suppl 4: S13-17
- Trenerry MK, Carey KA, Ward AC, Cameron-Smith D (2007) STAT3 signaling is activated in human skeletal muscle following acute resistance exercise. J Appl Physiol 102: 1483-1489
- Trenerry MK, Carey KA, Ward AC, Farnfield MM, Cameron-Smith D (2008) Exercise-induced activation of STAT3 signaling is increased with age. Rejuvenation Res 11: 717-724
- Trostler N, Romsos DR, Bergen WG, Leveille GA (1979) Skeletal muscle accretion and turnover in lean and obese (ob/ob) mice. Metabolism 28: 928-933
- Uotani S, Abe T, Yamaguchi Y (2006) Leptin activates AMP-activated protein kinase in hepatic cells via a JAK2-dependent pathway. Biochemical and biophysical research communications 351: 171-175
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM (1996) Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. Nat Genet 14: 95-97
- Van Gheluwe B, M. H (1986) Muscle actions and ground reaction forces in tennis. Int J Sports Biomech 2: 88-89
- Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, Rogol AD, Lovejoy JC, Sheffield-Moore M, Mauras N, Bowers CY (2005) Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. Endocrine reviews 26: 114-146
- Volek JS, Vanheest JL, Forsythe CE (2005) Diet and exercise for weight loss: a review of current issues. Sports medicine (Auckland, NZ 35: 1-9
- Wabitsch M, Blum WF, Muche R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, Hauner H (1997) Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. J Clin Invest 100: 808-813
- Wagers AJ, Conboy IM (2005) Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. Cell 122: 659-667
- Wauters M, Considine RV, Chagnon M, Mertens I, Rankinen T, Bouchard C, Van Gaal LF (2002) Leptin levels, leptin receptor gene polymorphisms, and energy metabolism in women. Obes Res 10: 394-400
- White DW, Tartaglia LA (1996) Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor. Cytokine Growth Factor Rev 7: 303-309

- Widegren U, Jiang XJ, Krook A, Chibalin AV, Bjornholm M, Tally M, Roth RA, Henriksson J, Wallberghenriksson H, Zierath JR (1998) Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. Faseb J 12: 1379-1389
- Wilkinson SB, Tarnopolsky MA, Grant EJ, Correia CE, Phillips SM (2006) Hypertrophy with unilateral resistance exercise occurs without increases in endogenous anabolic hormone concentration. Eur J Appl Physiol 98: 546-555
- Willardson JM (2006) A brief review: factors affecting the length of the rest interval between resistance exercise sets. Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association 20: 978-984
- Willardson JM (2007) The application of training to failure in periodized multiple-set resistance exercise programs. J Strength Cond Res 21: 628-631
- Winder WW, Taylor EB, Thomson DM (2006) Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise. Medicine and science in sports and exercise 38: 1945-1949
- Wojtaszewski JF, Mourtzakis M, Hillig T, Saltin B, Pilegaard H (2002) Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during prolonged exercise. Biochemical and biophysical research communications 298: 309-316
- Wojtaszewski JF, Nielsen P, Hansen BF, Richter EA, Kiens B (2000) Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. The Journal of physiology 528 Pt 1: 221-226
- Wozniak AC, Kong J, Bock E, Pilipowicz O, Anderson JE (2005) Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. Muscle Nerve 31: 283-300
- Yasari S, Wang D, Prud'homme D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM (2009) Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and, -e in rats. Mol Cell Biochem 324: 13-20
- Yaspelkis BB, 3rd, Davis JR, Saberi M, Smith TL, Jazayeri R, Singh M, Fernandez V, Trevino B, Chinookoswong N, Wang J, Shi ZQ, Levin N (2001) Leptin administration improves skeletal muscle insulin responsiveness in diet-induced insulin-resistant rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E130-142
- Yu JG, Furst DO, Thornell LE (2003) The mode of myofibril remodelling in human skeletal muscle affected by DOMS induced by eccentric contractions. Histochem Cell Biol 119: 383-393.
- Yu JG, Malm C, Thornell LE (2002) Eccentric contractions leading to DOMS do not cause loss of desmin nor fibre necrosis in human muscle. Histochem Cell Biol 118: 29-34
- Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV, Krook A, Zierath JR (2001) Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. J Physiol 536: 273-282
- Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG (2002) PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. Developmental cell 2: 489-495

- Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB (2008) Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. The Journal of biological chemistry 283: 14230-14241
- Zaccaria M, Ermolao A, Roi GS, Englaro P, Tegon G, Varnier M (2002) Leptin reduction after endurance races differing in duration and energy expenditure. Eur J Appl Physiol 87: 108-111
- Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? J Cell Biol 166: 347-357
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-432

9. Apéndices-estudios I-IV.

ESTUDIO I

The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, fiber-type distribution and muscle strength

J. Sanchis-Moysi¹, F. Idoate², H. Olmedillas¹, A. Guadalupe-Grau¹, S. Alayón³, A. Carreras³, C. Dorado¹, J. A. L. Calbet¹

¹Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria 35017, Spain, ²Radiology Department, Clínica San Miguel, C/Beloso Alto 32, 31006 Pamplona, Spain, ³Diagnostic Imaging Department, Hospital San Roque Maspalomas, Grupo San Roque, Maspalomas 35100, Gran Canaria, Spain Corresponding author: Jose A. L. Calbet, Departamento de Educación Física, Campus Universitario de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Canary Island, Spain. Tel: 0034 928 458 896, Fax: 0034 928 458 867, E-mail:lopezcalbet@gmail.com

Accepted for publication 8 April 2009

The effects of professional tennis participation on dominant and non-dominant upper extremity muscle volumes, and on fiber types of triceps brachii (lateral head) and vastus lateralis muscles were assessed in 15 professional tennis players. Magnetic resonance imaging (MRI, n = 8) examination and dual-energy x-ray absorptiometry (DXA, n = 7) were used to assess muscle volumes and lean body mass. Muscle fiber-type distribution assessed by biopsy sampling was similar in both triceps brachii (2/3 were type 2 and 1/3 type 1 fibers). The VL was composed of 1/3 of type 2 and 2/3 of type 1 fibers. The dominant had 12–15% higher lean mass (DXA/MRI) than the non-dominant (P < 0.05). Type 1, 2a

Because of its asymmetric nature, tennis is an excellent exercise model to study muscle plasticity in response to chronic exercise. Tennis players subject their dominant upper extremity to an enormous amount of physical activity compared with their contralateral upper extremity. As a consequence, the lean mass of the dominant upper extremity is between 10% and 20% higher compared with that of the non-dominant upper extremity in elite tennis players (Calbet et al., 1998; Sanchis Moysi et al., 1998). Although it is reasonable to assume variations in the relative contribution of the muscle groups to the overall muscle hypertrophy of the dominant arm, this has not been investigated in tennis players. In the only study where muscle biopsies were obtained from both deltoid muscles, it was concluded that regular tennis training does not elicit significant adaptations in fiber types and fiber area, when the contralateral deltoid muscle is used as a control (Mavidis et al., 2007). Thus, the dominant arm muscle hypertrophy of tennis players must occur in other muscles, and in this respect, studies have shown that the m. triceps brachii plays an important role in power generation in the different tennis strokes (Buckley & Kerwin, and 2x muscle fibers of the dominant were hypertrophied compared with the non-dominant by 20%, 22% and 34% (all P < 0.01), respectively. The deltoid, triceps brachii, arm flexors and forearm superficial flexor muscles of the dominant were hypertrophied (MRI) compared with the non-dominant by 11–15%. These muscles represented a similar fraction of the whole muscle volume in both upper extremities. Dominant muscle volume was correlated with 1RM on the one-arm cable triceps pushdown exercise (r = 0.84, P < 0.05). Peak power during vertical jump correlated with VL muscle fibers's cross-sectional area (r = 0.82-0.95, P < 0.05).

1988; Chow et al., 1999, 2007). An early study of Mero et al. (1991) reported a predominance of slow twitch fibers in the m. vastus lateralis of 11-13-yearold tennis players. However, it remains unknown what is the predominant muscle phenotype in adult professional tennis players and how this muscle adapts to the load imposed by participation in professional tennis. Likely, muscle volumes and muscle morphology influence performance in tennis players. A better knowledge of the morphology and adaptability of the upper and lower extremity muscles in professional tennis players could contribute toward enhancing our knowledge of the physiological demands imposed by professional tennis. This information may be useful in the future to advance in the understanding of the mechanisms leading to overload injuries.

Therefore, the main purpose of this study was to describe the effect of professional tennis participation on the muscle volumes of the dominant upper extremity, using the non-dominant upper extremity as control. A secondary aim was to specifically determine the fiber-type composition and fiber cross-sectional areas (CSA) of the m. *triceps brachii*

Sanchís-Moysi et al.

of the dominant and non-dominant arm, to assess the effect that chronic loading may exert in this specific muscle. Finally, we aimed at determining the muscle morphology of the vastus lateralis, as a representative of the muscles of the lower extremities, and the power-generating capacity of the lower extremities in professional tennis players.

Methods

Subjects

In total, 15 tennis players (22.9 \pm 3.9 years) agreed to participate in the study (Table 1). Subjects were divided into two groups of seven and eight, named the muscle biopsy group and the magnetic resonance imaging (MRI) group, respectively. All subjects were informed about the potential benefits and risk of the study and gave a written consent to participate. The study was approved by the ethical committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria. All the subjects started tennis practice before 12 years of age and had been training and participating in professional tennis competitions of the International Tennis Federation (Futures and Challengers tournaments). Studies were carried out during the Maspalomas International Tennis Tournament (Gran Canaria, Spain), which was held in November close to the end of the season. All of them were training and competing normally and none of them had any period of inactivity during the days preceding the tests.

Assessment of body composition

In the seven subjects of the muscle biopsy group, the body composition, arm and leg lean masses were determined by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) (Hologic QDR-1500, Hologic Corp., software version 7.10, Waltham, Massachusetts, USA) as described elsewhere (Perez-Gomez et al., 2008a, b). From the whole-body scans, the arm region, including the hand, forearm, arm and most of the shoulder muscles, was defined by an inclined line crossing the scapulo-humeral joint, such that the humeral head was located in the arm region. The leg region included the foot and the lower and upper leg, and was separated from the trunk by an inclined line passing just below the pelvis, which bisected the femoral neck. The lean mass of the extremities was assumed to be equivalent to the muscle mass (Calbet et al., 1998; Sanchis Moysi et al., 1998; Kim et al., 2002, 2006).

Table 1. Subject's characteristics (mean \pm SD)

	Muscle biopsy $(n=7)$	MRI (<i>n</i> = 8)
Age (years)	24.1 ± 4.0	21.9 ± 3.8
Total body mass (kg)	75.7 ± 8.9	75.4 ± 6.9
Height (cm)	182.4 ± 9.4	182.5 ± 3.9
Total body fat (%)	10.3 ± 3.5	-
Current training volume (h/week) Dominant arm/backhand stroke	23 ± 8	25 ± 7
Right/2 hands backhand	6/4	6/2
Left/2 hands backhand	1/0	2/0

MRI, Magnetic resonance imaging; SD, Standard deviation.

Muscle biopsies

On a different day, subjects reported to the laboratory at 8:00 hours after an overnight fast. After a 10-min rest in the supine position, the skin over the lateral aspect of both m. *triceps brachii* (lateral head) and the middle portion of the m. *vastus lateralis* was anesthetized with 2% lidocaine. Thereafter, muscle biopsies were obtained using Bergstrom's technique and processed as described elsewhere (Brooke & Kaiser, 1970; Guerra et al., 2008). The number of muscle fibers analyzed [mean (range)] was 125 (106–147) and 132 (97–149) for the dominant and non-dominant m. *triceps brachii*, and 140 (114–156) for the m. *vastus lateralis*.

Myosin heavy-chain analyses (MyHC) were performed on the muscle biopsies using sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gels were Coomassie stained and MyHC isoform bands (I, IIA and IIX) were determined based on known migration patterns and quantified with Quantity One[®] from Bio-Rad Laboratories (Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK). A representative example is depicted in Fig. 1.

Dynamic force

The vertical forces generated during vertical jumps were measured with a force plate (Kistler, Winterthur, Switzerland) and sampled at 500 Hz. Each tennis player from the muscle biopsy group performed two kinds of maximal jumps: the squat jump (SJ), starting with knees bent at 90° and without previous countermovement, and the countermovement jump (CMJ), starting from a standing position allowing for counter movement, with the intention of reaching knee bending angles of around 90° just before impulsion. The jumping heights (Hi) generated were determined by integration of the vertical ground reaction forces in the best of three trials in both kinds of jumps: SJ and CMJ (Bojsen-Moller et al., 2005). During the push-off phase, the vertical velocity of the center of masses was determined by integration over time of the acceleration, which, in turn, was calculated from the ground reaction force signal. Instantaneous jump power was continuously calculated as the product of vertical ground reaction force and center of mass velocity (Caserotti et al., 2008). The peak rate of force development was defined as the maximal tangential slope of the force-time curve derived over any 4-ms time period during the push-off phases of the jumps.

The dynamic strength of the m. *triceps brachii* muscle of each arm was assessed in the subjects from the MRI group by determining the one-repetition maximum (1 RM) on the onearm cable triceps pushdown exercise. During the test, subjects had to extend completely the elbow starting from a 90° angle with the palms of the hands facing up. Each subject performed two warm-up sets with increasing weight, with 3 min of rest between sets. After warm-up, 1 RM attempts were performed with increasing weight 1–5 kg weights until the subjects were not able to complete the extension of the elbow. Weights were chosen so that the 1 RM could be determined in three to five attempts. After each attempt with the dominant arm the subjects performed the test with the non-dominant arm. One minute of rest was given between attempts.

MRI group

MRI was used to determine the muscle CSA and muscle volume of the arm and forearm muscles. A 1.5 T MRI scanner (Philips Achieva 1.5 Tesla system, Philips Healthcare, Best, the Netherlands) was used to acquire 10-mm axial contiguous slices from each arm independently, i.e., without interslice separation. Because of the limitation of the table top transla-



N-DA



Fig. 1. Example in one tennis player of the myosin heavy-chain isoform composition (MyHC) and muscle morphology of the lateral head of the m. triceps brachii and vastus lateralis (VL). (a) Coomassie-stained sodium dodecylsulfate gel for MyHC analysis in muscle samples from VL and the lateral head of the non-dominant (N-DA) and dominant (DA) m. triceps brachii. (b) Cryosections stained for myofibrillar ATPase after preincubation at pH 4.3 showing slow-type (1) and fast-type (2) muscle fibers. Scale bar = $50 \,\mu m$.

tion, each arm volume was scanned using two stacks of slices. Sagittal, coronal and transverse localizers of the arm were obtained to determine precisely the anatomic sites for image acquisition. The upper limit was the superior border of the acromioclavicular joint and the lower limit was the distal radiocubital joint. The following procedures, in chronological order, were carried out: distal part (forearm), subject repositioning and proximal part (arm) acquisition. The tip of the olecranon was used as the anatomical boundary between the two stacks. Axial spin-echo T1-weighted MR images were acquired using a repetition time of 820 ms and an echo time of 20 ms, with a 35 cm^2 field of view and a matrix of 512×512 pixels (in-plane spatial resolution $0.68 \text{ mm} \times 0.68 \text{ mm}$).

The acquired MRI images were transferred to a PC computer for digital reconstruction to determine the CSA. All calculations were carried out by the same investigator (F. I.) blinded to arm dominance using a specially designed image analysis software (SliceOmatic 4.3, Tomovision Inc., Montreal, Canada) for quantitative analysis of the images, as described elsewhere (Lee et al., 2000).

In the arms, the volumes of the following muscles were assessed: the flexor compartment (m. biceps brachii, m. brachialis and m. coracobrachialis), m. triceps and m. deltoid. In the forearms, we determined the muscle volumes of: mobile wad (m. brachioradialis, m. extensor carpi radialis longus, m. extensor carpi radialis brevis), superficial flexor (m. pronator teres, m. flexor carpi radialis, m. flexor carpi ulnaris, m. palmaris longus, m. flexor digitorum superficialis), deep flexor (m. pronator quadratus, m. flexor digitorum profundus, m. flexor pollicis longus), extensor (m. extensor carpi ulnaris, m. extensor digitorum communis, m. extensor digiti minimi, m. anconeus, m. extensor indicis propius, m. extensor pollicis longus, m. extensor pollicis brevis, m. abductor pollicis longus) and m. supinator (Boles et al., 2000; Bancroft et al., 2007) (Fig. 2). To determine the distribution of muscle volume among muscles of a given tennis player, we calculated volume fraction (Fraction_m), expressed as a percentage of total muscle volume (V_{total}) , for each muscle

$$Fraction_m = 100 \times V_m / V_{total},$$

where $V_{\rm m}$ is the individual muscle volume for a given subject (Holzbaur et al., 2007). The mean volume fraction for each muscle across subjects was also calculated.

The intra-observer coefficient of variation for the segmentation analysis with determination of the muscle volumes included in this study was 8.2%, 2.5%, 7.4%, 0.9%, 1.5%, 2.6%, 3.6% and 0.9% for the deep flexor, superficial flexor, mobile wad, wrist extensors, m. supinator, m. deltoid, arm flexors, m. triceps and whole upper extremity, respectively.

Statistical analysis

Data were analyzed using the SPSS statistical program (SPSS 8.0 Inc., Chicago, Illinois, USA). Side-to-side comparisons were carried out using the paired Student's t-test. Statistical significance was set at P < 0.05 level. The relationship between muscle variables of the same arm and between muscle and fitness variables was determined by a bivariate correlation and linear regression analysis. Results are presented as means \pm standard deviation, except on the bar figures, which are presented as means \pm standard error of the mean.



Fig. 2. Cross-sectional magnetic resonance images at the level of the mid forearm (a) and mid-arm (b) of one right-handed tennis player. Top, magnetic resonance imaging gray-scale images; bottom, corresponding analyzed images, showing the different muscle compartments measured. *Forerarm* (a): in blue, the *mobile wad*; in red, the deep flexor compartment; in green, the superficial flexor compartment; and in magenta, the extensor compartment. *Arm* (b): in light blue, the m. *triceps brachii*; in pink, the flexor compartment; and in orange, the *deltoid* muscle.

Results

Dual-energy x-ray absorptiometry

The lean mass was 15% greater in the dominant than in the contralateral arm (3653 ± 467 vs 3194 ± 390 g, P < 0.001). However, the lean mass of both lower extremities was similar (10447 ± 1201 vs $10440 \pm$ 1480 g, right and left leg, respectively, P = 0.97).

Triceps brachii morphology and MyHC isoform composition

Muscle-fiber type distribution in the dominant m. triceps brachii was $38 \pm 16\%$, $42 \pm 11\%$ and $14 \pm$ 11% for type 1, 2a and 2x, respectively. Similar values were observed in the non-dominant arm $(39 \pm 13,$ 44 ± 14 and 11 ± 7 , for type 1, 2a and 2x, respectively) (Fig. 3(a)). The type 1, 2a and 2x muscle fibers of the dominant m. triceps brachii were hypertrophied compared with the non-dominant m. triceps brachii by 20 (4962 \pm 452 and 4210 \pm 460 μ m², P<0.01), 22 $(7700 \pm 873 \text{ and } 6311 \pm 707 \,\mu\text{m}^2, P < 0.01)$ and 34% $(7058 \pm 878 \text{ and } 5225 \pm 451 \,\mu\text{m}^2, P < 0.01)$, respectively (Fig. 3(b)). The mean area of all muscle fibers was 25% higher in the dominant than in the nondominant m. triceps brachii (P<0.001). The fiber-type distribution calculated as area percentage did not differ between the dominant and the non-dominant arms (Fig. 3(c)). In both arms, the area percentage of type 2a fiber was greater than type 1 (P < 0.001) and type 2x fibers (P < 0.05).

MyHC composition was similar in both m. *triceps brachii*. MyHC I, IIA and IIX composition was 35 ± 19 and $37 \pm 20\%$, $44 \pm 7\%$ and $46 \pm 18\%$, and $5 \pm 7\%$ and $5 \pm 9\%$ in the dominant and non-dominant arm, respectively (P = NS).

In the non-dominant arm, muscle fibers type 1 and 2a distribution positively correlated with their corre-

sponding MyHC I and IIA composition (r = 0.89, P < 0.01 and r = 0.82, P < 0.05, respectively). However, in the dominant arm only type 1 muscle fiber percentage positively correlated with the percentage of MyHC I (r = 0.85, P < 0.05) and a non-significant correlation was observed between muscle fiber type 2a percentage and the percentage of MyHC IIA (r = 0.44, P = 0.33).

Vastus lateralis morphology and MyHC isoform composition

Muscle fiber type 1 was predominant in the *vastus* lateralis muscle $(62 \pm 7\%)$, followed by type 2a $(33 \pm 4\%)$ and type 2x $(5 \pm 3\%)$ (Fig. 3(a)). This was confirmed in the MyHC analysis $(68 \pm 10\%)$, $31 \pm 8\%$ and $1 \pm 2\%$, for MyHC I, IIA and IIX, respectively). MyHC IIX isoform expression was observed in the m. *vastus* lateralis in only three tennis players. Type 1 muscle fibers occupied a greater area percentage of the m. *vastus* lateralis (59.6 ± 2.5\%) than type 2a $(35.6 \pm 1.7\%)$, P < 0.001) and type 2x $(4.6 \pm 1.1\%)$, P < 0.05, the difference between 2a and 2x also being significant (Fig. 3(c)).

Comparison between vastus lateralis and triceps brachii

The percentage of type 1 muscle fiber was higher in the vastus lateralis compared with the m. triceps brachii of the dominant (P < 0.001) and non-dominant arm (P < 0.05) (Fig 3(a)), while the percentage of type 2a muscle fiber was greater in the m. triceps brachii than in the vastus lateralis (P < 0.01 and P < 0.05, for the dominant and the non-dominant arm, respectively). The dominant m. triceps brachii had a higher percentage of type 2x muscle fibers compared with the vastus (P < 0.05), while no such differences were observed between the non-dominant



Fig. 3. Fiber-type distribution (a), cross-sectional area (CSA) (b) and relative fiber-type proportions based on muscle fiber CSA (c) in the dominant m. *triceps brachii* (black bars), non-dominant m. *triceps brachii* (gray bars) and m. *vastus lateralis.* *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

arm and the *vastus lateralis*. These findings were confirmed by the MyHC analysis.

The CSA of type 2a muscle fibers was 26% smaller in the vastus lateralis than in the dominant arm m. *triceps brachii* (P < 0.05) (Fig. 3(b)). Type 1 muscle fibers's CSA was 17% greater in the vastus lateralis compared with the non-dominant m. *triceps brachii* (P < 0.05). No differences were observed in type 2x CSA between the vastus lateralis and either the dominant or the non-dominant arm (P = 0.13 and 0.73, respectively) (Fig. 2(b)). The mean area of all muscle fibers was similar in the vastus lateralis muscle compared with the m. *triceps brachii* of the dominant (P = 0.59) and the non-dominant arm (P = 0.22), respectively.

The tennis player upper extremity

The area percentage occupied by type 2 fibers represented 2/3 of the whole area in the muscle biopsy obtained from the lateral head of the m. *triceps brachii* and 1/3 in the *vastus lateralis* (P < 0.05) (Fig. 3(c)).

Performance, MyHC isoform composition and muscle morphology

Tennis players achieved $10 \pm 3\%$ higher 1 RM values with the dominant than with the non-dominant arm (15.2 ± 0.7 and 13.8 ± 0.7 kg, respectively, *P*<0.05). A positive correlation was observed between the muscle volume and the 1 RM of the dominant arm (*r* = 0.84, *P*<0.05). CMJ and SJ jumping height was 0.36 ± 0.06 and 0.30 ± 0.05 m, respectively. Peak instantaneous power during the CMJ and SJ was 3869 ± 532 and 3542 ± 519 W, respectively. The maximum rate of force development during the CMJ and SJ was 10.22 ± 4.82 and 8.51 ± 2.86 kN/s, respectively.

Jumping height during the CMJ and SJ was correlated with the CSA of type 1 (r = 0.84 and 0.83, respectively, both P < 0.05) and type 2a muscle fibers (r = 0.75 and 0.89, respectively, both P < 0.05). A similar correlation was observed between CMJ and SJ peak power and the CSA of type 1 (r = 0.83 and 0.82, respectively, both P < 0.05) and 2a muscle fibers (r = 0.95 and 0.83, respectively, both P < 0.05).

MRI

Table 2 summarizes the muscle volumes of the dominant and non-dominant arm and the relative contribution of each muscle group to the total muscle volume of the corresponding arm. Compared with the contralateral arm, the dominant arm had a 12% greater mean muscle volume (P < 0.001). All the muscle groups of the dominant arm were hypertrophied compared with the non-dominant arm: the *deltoid* muscle 15% (P < 0.001), the arm flexors 11% (P < 0.05) and the m. *triceps brachii* 12% (P < 0.05). The hypertrophied arm muscles maintained similar proportions between them, and hence represented the same relative amount of the whole arm muscle mass in both the dominant and the non-dominant arm (Table 2) (Fig. 4).

There was some between-subjects inter-individual variation in forearm muscle volumes. The volume of the superficial flexor muscles of the forearm was 15% greater in the dominant compared with the contralateral forearm (P < 0.05). No significant differences were observed between the dominant and the non-dominant forearm in deep flexors, *mobile wad*, forearm extensors and m. *supinator* muscle volumes (P = 0.28, 0.09, 0.67 and 0.62, respectively) (Table 2).

	Forearm muscle	e groups				Arm muscle grou	sdi		Total muscle volume
	Deep flexors	Superficial flexors	Mobile wad	Extensors	Supinator	Deltoid	Arm flexors	Triceps	
Non-dominant arm	158.6 ± 35.9	228.0 ± 4.5	181.9 ± 68.0	139.0 ± 38.1	26.4 ± 18.6	496.8 ± 110.8	425.1 ± 71.2	503.0 ± 96.7	2158.8 ± 323.5
Volume traction (%)	7.3 173 8 ⊥ 98 5	10.6 ว63 ∩ ⊥ 30 6 ^b	8.4 220 F ⊥ 74 1	6.4 1лее — рле	1.2 221 ± 6.8	23.0 572 6 ± 107 8°	19.7 ито в 🗕 71 ва	23.3 664 2 ± 07 6ª	- олоса ⊥ л17 ∩ ^b
Volume fraction (%)	7.2	10.8 ± 33.0	253.J ⊥ / 4. I 9.5	6.0 ± 24.0	23.1 ± 0.0	23.6	470.0 ± 71.0 19.4	23.3	0.114 H C.0242
Holzbaur et al. (2007)									
*Volume fraction (%)	7.6	12.3	7.8	5.7	1.2	24.0	19.7	23.5	1583

 $^{\circ}P < 0.001$ dominant compared with non-dominant arm.

*Calculated using data from Holzbaur et al. (2007)

Table 3 summarizes the correlations observed between muscle groups in the dominant arm and in the non-dominant arm. A positive linear relationship was observed between the volume of each muscle group of the arm and the total muscle volume of the dominant arm and the same occurred in the nondominant arm. These linear relationships had similar slopes and intercepts.



Fig. 4. Relationships between the muscle volume of the deltoid, arm flexors and triceps brachii muscles and the whole volume of the upper extremity in the dominant (black circles) and non-dominant (white circles) arms. Non-statistical significant differences were observed between the slopes or intercepts.

	Forearm muscle groups					Arm muscle	groups	
	Deep flexors	Superficial flexors	Mobile wad	Extensors	Supinator	Deltoid	Arm flexors	Triceps
Dominant upper extremity Forearm muscle groups Deep flexors Superficial flexors Mobile wad Extensors Supinator Arm muscle groups Deltoid Arm flexors Triceps Total muscle volume Non-dominant upper extrei Forearm muscle groups Deep flexors Nobile wad Extensors Supinator Arm flexors Deeptoid Arm muscle groups Deltoid Arm muscle groups Deltoid Arm flexors Supinator Arm flexors Deltoid Arm flexors Deltoid	$ \begin{array}{c} -\\ r=0.41, \ P=0.32\\ r=0.62, \ P=0.10\\ r=0.75^{a}\\ r=0.11, \ P=0.79\\ r=0.61, \ P=0.79\\ r=0.61, \ P=0.79\\ r=0.78^{a}\\ r=0.78^{a}\\ r=0.78^{a}\\ r=0.36, \ P=0.07\\ r=0.30, \ P=0.47\\ r=0.364 \ P=0.41\\ r=0.23, \ P=0.40\\ r=0.23, \ P=0.59\\ r=0.59\\ r=0$	$ \begin{array}{c} & -\\ & r=0.12, \\ r=0.71^{a}\\ r=0.63, \\ P=0.63, \\ P=0.09\\ r=0.58, \\ P=0.10\\ r=0.61, \\ P=0.10\\ r=0.11, \\ P=0.74\\ r=0.76^{a}\\ r=0.76^$	$ \begin{array}{c} - \\ r = 0.53, \ P = 0.17 \\ r = -0.16, \ P = 0.71 \\ r = 0.59, \ P = 0.12 \\ r = 0.40, \ P = 0.33 \\ r = 0.42, \ P = 0.31 \\ r = 0.42, \ P = 0.31 \\ r = 0.42, \ P = 0.31 \\ r = 0.08, \ P = 0.47 \\ r = -0.30, \ P = 0.47 \\ r = -0.30, \ P = 0.75 \\ r = 0.08, \ P = 0.75 \\ r =$	$ \begin{array}{c} -\\ r = 0.48, \ P = 0.23\\ r = 0.79^{a}\\ r = 0.91^{b}\\ r = 0.73^{a}\\ r = 0.73^{a}\\ r = 0.05, \ P = 0.91\\ r = -0.06, \ P = 0.89\\ r = -0.06, \ P = 0.86\\ r = -0.06, \ P = 0.06\\ r = -0.06\\ r = -0.06$	$ \begin{array}{c} - \\ r = 0.32, \ P = 0.44 \\ r = 0.34, \ P = 0.41 \\ r = 0.29, \ P = 0.49 \\ r = 0.22, \ P = 0.49 \\ r = 0.60 \\ r = 0.614 \\ r = 0.67 \\ r $	r = 0.82ª r = 0.82ª r = 0.97° r = 0.92° r = 0.92°	r = 0.87b r = 0.91c r = 0.98c r = 0.98c	
total muscle volume ${}^{a}P < 0.05$, ${}^{b}P < 0.01$ and ${}^{c}P < 0.001$.	1 = 0.32, T = 0.44	- 70°0 = 7	v = 0.13, T = 0.30	r = 0.07, r = 0.07	1 = 0.21, Y = 0.02	1 = 0.30	- = -	C6:0 = 1

Table 3. Correlations between muscle volumes in the dominant and non-dominant upper extremities

7

Discussion

The present investigation shows that professional tennis elicits identical relative magnitude of hypertrophy for the m. deltoid, m. triceps brachii, arm flexors and superficial flexors of the forearm. More importantly, these muscles represent a similar fraction of the whole muscle volume of the upper extremity in the dominant and the non-dominant arm. In addition, our data indicate that professional tennis players have a muscle morphology in the m. vastus lateralis with a predominance of type 1 muscle fibers, similar to that described in cyclists (Horowitz et al., 1994; Rodriguez et al., 2002), although the mechanical and metabolic properties of type 1 fibers may differ considerably in the same muscle group in different athletes (Schiaffino & Reggiani, 1996). Moreover, we have observed that tennis participation is not associated with major between-arm differences in triceps brachii muscle fiber-type composition, because both arms have a similar fiber-type distribution and MyHC composition. This finding is unexpected because type 2x fibers are reduced with training and a number of studies have shown limited capacity to change muscle fiber types from slow to fast with strength training (Jansson et al., 1990; Andersen & Aagaard, 2000; Perez-Gomez et al., 2008a). Only the combination of strength training with ballistic and stretch-shortening movements has been shown to induce an increase in MyHC IIA and a decrease in MyHC I, indicating slow to IIA and IIX to IIA shifts of MyHC isoform composition (Andersen & Aagaard, 2000; Liu et al., 2003; Perez-Gomez et al., 2008a; Guadalupe-Grau et al., 2009). Interestingly, this combined training seems to attenuate the reduction in MyHC IIX normally seen with strength training (Liu et al., 2003) and other types of training (Terzis et al., 2006) in the m. triceps brachii.

Because we do not have longitudinal data, we do not know the percentage of MyHC IIX in both arms of these professional tennis players before the start of their career. In non-trained arms the percentage of MyHC IIX ranges between 17% and 38% (Jurimae et al., 1997; Gjøvaag & Dahl, 2009). The proportion of MyHC IIX reported here for both m. triceps brachii is similar if not lower than that published in strength-trained m. triceps brachii including bodybuilders (Jurimae et al., 1997; Gjøvaag & Dahl, 2009). Nevertheless, this does not explain why the contralateral arm is not having a greater proportion of MyHC IIX than the dominant arm. A possible reason is that the sporadic involvement of the contralateral arm in some tennis actions, together with the influence of the bilateral conditioning exercises, are enough to induce a reduction in MyHC IIX. In support, it has been shown that MyHC IIX composition decreases similarly with low (30% 1 RM)- and high (60% 1 RM)-intensity strength training to a mean value of 7%, i.e., close to the 5% observed in our tennis players (Giøvaag & Dahl, 2009). Strength training at intensities as low as 16% 1 RM is able to elicit some muscle hypertrophy (Holm et al., 2008). Although we do not have longitudinal data, the fact that the CSA of the type 2 muscle fibers (Fig. 3(b)) was similar in the non-dominant m. triceps brachii and the m. vastus lateralis is compatible with some degree of muscle hypertrophy in the non-dominant m. triceps brachii. Moreover, the CSA of the type 2 fibers of the non-dominant m. triceps brachii of our tennis players was similar to the CSA observed in the m. triceps brachii after strength training (Gjøvaag & Dahl, 2008).

Our results agree with previous studies showing 10–20% more muscle mass in the dominant compared with the contralateral arm in tennis players (Calbet et al., 1998; Sanchis Moysi et al., 1998; Ducher et al., 2005). The increased muscle mass of the dominant arm and particularly the relative hypertrophy of the m. *triceps brachii* can only be explained as a consequence of the mechanical demand sustained by this muscle, because any other genetic, nutritional or hormonal factors are also acting on the contralateral arm, which has smaller muscle fibers.

The mean area of all muscle fibers was 25% higher in the dominant than in the non-dominant arm, and as expected, type 2 fibers showed a greater level of hypertrophy than type 1 fibers (Costill et al., 1979; Aagaard et al., 2001; Gjøvaag & Dahl, 2008). The level of hypertrophy achieved by these tennis players is remarkably high if one takes into consideration that with 3-5 months of strength training, in previously untrained subjects, exceptionally is the CSA of the m. vastus lateralis enhanced above 15% (Hather et al., 1991; Aagaard et al., 2001). Moreover, such a level of m. vastus lateralis hypertrophy has been reported only when the strength training program combined concentric and eccentric exercises (Hather et al., 1991; Aagaard et al., 2001). However, compared with leg muscles, arm muscles have a greater potential for muscle hypertrophy in response to strength training (Abe et al., 2000) and endurance combined with strength training (Terzis et al., 2006). For example, Gjøvaag and Dahl (2008) have reported that with only 8 weeks of strength training muscle fiber CSA in the lateral head of the nondominant m. triceps brachii was increased by 14% and 19% in the type 1 and type 2 fibers (2a and 2x combined). Although our tennis players had a greater CSA in the lateral head of the m. triceps brachii than that achieved by the subjects of Gjøvaag and Dahl (2008), their mean CSA remained below that observed in m. biceps brachii of body builders (MacDougall et al., 1984; Alway et al., 1989).

The inter-arm difference in lean and muscle mass (15-12%) was smaller than the difference in the CSA of the m. triceps brachii (25%), emphasizing the relative importance of this muscle in tennis players. In fact, our study shows that this muscle alone accounts for almost 1/4th of the arm muscle mass. In the last three decades, studies using cinematography and electromyography recording have shown that an elbow extension movement, with participation of m. triceps brachii, occurs in most tennis strokes. For example, during the service stroke m. triceps brachii muscle contributes to the active acceleration of the racket previous to the ball impact (Van Gheluwe & Hebbelinck, 1986). In the forehand stroke, the triceps display strong activity during ball impact in order to counteract the maximal contraction of m. biceps brachii and m. brachioradialis (Van Gheluwe & Hebbelinck, 1986). The one-hand and the two-hand backhand strokes also require the activation of the m. triceps brachii, as well as during the forehand and backhand volleys, being greater during the backhand volley (Chow et al., 1999, 2007).

The fact that the magnitude of hypertrophy of the muscle fibers of the lateral head of the m. *triceps brachii* is more than twice the mean increase in muscle mass also suggests that this specific region of the muscle is submitted to an overload likely higher than that supported by other muscles of the arm.

This study lends support for an important role of muscle size for lower extremity power generation (Perez-Gomez et al., 2008b), as reflected by the close correlation between CSA of the type 1 and 2a fibers in the m. vastus lateralis and peak power output during the vertical jump. Likewise, a correlation was also observed between the muscle mass of the arm and 1 RM. The fact that there was a predominant hypertrophy of type 2 fibers, which represented $\sim 68\%$ of the m. triceps brachii CSA, is also an adaptation that enables high-power generation. Type 1 fibers are rich in MyHC I myosin, have a lower maximum shortening velocity, maximum power, specific tension (force/cross-sectional area) and slower kinetics of stretch activation (Hilber et al., 1999) than type 2a and 2x fibers, which have a predominance of MyHC IIA and IIX, respectively (Schiaffino & Reggiani, 1996). The muscle fiber distribution of the lateral head of the m. triceps brachii of the dominant arm of tennis players is similar to that described for the long head (dominant arm) in physical education students (Terzis et al., 2003) or the lateral head (non-dominant arm) in young non-trained adults (Gjøvaag & Dahl, 2008).

Although the lateral head of the m. *triceps brachii* is remarkably hypertrophied in the dominant compared with the contralateral arm, the levels of asymmetry for *deltoid*, m. *triceps brachii*, arm flexors and

superficial flexors of the forearm were rather similar (11-15%), indicating that all these muscles are similarly recruited by tennis actions. Moreover, the calculated volume fraction of the muscles was rather similar in the dominant and the non-dominant upper extremity (Table 2), with the exception of the m. supinator. Moreover, as depicted in Fig. 4, the slope of the relationship between the muscle volume of the main muscular groups of the upper extremity and the total muscle volume was similar for both arms. Thus, the mechanical stimuli eliciting muscle hypertrophy appear to act similarly on the arm muscles of the playing arm. We can only compare our calculated volume fractions with those recently reported by Holzbaur et al. (2007). These authors assessed the individual muscle volume of the 31-32 muscles of the dominant upper extremity in five men and five women, physically active (Holzbaur K. R., personal communication), with a mean age, body mass and height of 29 years, 69 kg and 172 cm. Interestingly, in these subjects, the mean volume fractions of their dominant arm muscles were very close to those observed in the dominant arm of our tennis players (Table 2). However, there was slightly less agreement in forearm muscles. In turn, the supinator muscle represented the same volume fraction in the non-dominant arm of tennis players and the dominant arm of the subjects studied by Holzbaur et al. (2007); its volume fraction was 26% lower in the dominant arm of the tennis players compared with the dominant arm of Holzbaur et al.'s subjects (2007). This could indicate that proportionally this muscle is less loaded by tennis actions than the other muscles of the upper extremity.

Finally, also using the data reported by Holzbaur et al. (2007), we have calculated that the mean muscle volume (for the same muscles as those measured in our tennis players) was 1583 cm³ in Holzbaur and colleagues' subjects. After accounting for the differences in body height by dividing the upper extremity muscle volume by the height³, it emerges that, for a given height, the tennis players have 27% more muscle volume in their dominant arm than the subjects studied by Holzbaur et al. (2007).

In summary, this study describes for the first time the effects of tennis participation on the muscle volumes of the dominant arm, using the contralateral arm as control. Our study indicates that professional participation in tennis elicits muscle hypertrophy in the dominant arm, but the hypertrophied muscles maintain the same proportions between them as observed in the contralateral arm, and in the dominant arm of young adults. However, the forearm muscles show considerable variability between tennis players. Despite the enormous amount of exercise and loading sustained by the m. *triceps brachii*, its muscle fiber-type composition is similar to that of the

Sanchís-Moysi et al.

contralateral arm, being characterized by a predominance of type 2 fibers. In contrast, the morphology of the m. *vastus lateralis* in professional tennis players is similar to that reported in road cyclists, i.e., is more suited for endurance than for power generation. Nevertheless, those tennis players with greater muscle fibers in the vastus lateralis are able to jump higher, due to greater capacity for force and power generation in the lower extremities.

Perspectives

Despite the fact that modern imaging techniques allow for the assessment of individual muscle volumes only few data on individual muscle volumes in athletes have been published (Holzbaur et al., 2007). In none of these studies has a complete segmentation of the main muscles of the upper extremity been performed. This information is critical, particularly in asymmetric sports, like tennis, because it may be useful to identify muscle disequilibriums, which could lead to overuse injuries, neural or vascular compressions (Yildiz et al., 2006; Oskarsson et al., 2007). This study reports the first data on the upper extremity muscle volumes in professional tennis players and shows a marked muscle hypertrophy of

References

- Aagaard P, Andersen JL, Dyhre-Poulsen P, Leffers AM, Wagner A, Magnusson SP, Halkjaer-Kristensen J, Simonsen EB. A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture. J Physiol 2001: 534: 613–623.
- Abe T, DeHoyos DV, Pollock ML, Garzarella L. Time course for strength and muscle thickness changes following upper and lower body resistance training in men and women. Eur J Appl Physiol 2000: 81: 174–180.
- Alway SE, Grumbt WH, Gonyea WJ, Stray-Gundersen J. Contrasts in muscle and myofibers of elite male and female bodybuilders. J Appl Physiol 1989: 67: 24–31.
- Andersen JL, Aagaard P. Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. Muscle Nerve 2000: 23: 1095–1104.
- Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ, Berquist TH, O'Connor MI. Compartmental anatomy relevant to biopsy planning. Semin Musculoskelet Radiol 2007: 11: 16–27.
- Bojsen-Moller J, Magnusson SP, Rasmussen LR, Kjaer M, Aagaard P. Muscle performance during maximal isometric and dynamic contractions is

the dominant arm muscles. Future muscle-segmentation studies in tennis players with chronic injuries are necessary to advance in the understanding of the biomechanics behind the injuries, but also to identify possible muscle disequilibriums that could contribute to these kinds of injuries. This knowledge could, in turn, be used to elaborate preventative programs to, for example, reinforce insufficiently hypertrophied muscles in tennis players with muscular deficits.

Key words: training, exercise, performance, hypertrophy, elbow, muscle hypertrophy.

Acknowledgements

We wish to thank Jose Navarro de Tuero for his excellent technical assistance and all the tennis players who volunteered in these studies. Special thanks are due to Sánchez-Casal Tennis Academy, and particularly to Emilio Sánchez Vicario for his crucial collaboration. We would also like to express our gratitude to Hospital San Roque Maspalomas (Gran Canaria) for allowing us to use their MRI facilities. This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFI2003-09638, BFU2006-13784, DEP 2006-56076-C06-04/ACTI and FEDER), and Gobierno de Canarias (PI2005/177).

- influenced by the stiffness of the tendinous structures. J Appl Physiol 2005: 99: 986–994.
- Boles CA, Kannam S, Cardwell AB. The forearm: anatomy of muscle compartments and nerves. Am J Roentgenol 2000: 174: 151–159.
- Brooke MH, Kaiser KK. Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. J Histochem Cytochem 1970: 18: 670–672.
- Buckley JP, Kerwin DG. The role of the biceps and triceps brachii during tennis serving. Ergonomics 1988: 31: 1621–1629.
- Calbet JA, Moysi JS, Dorado C, Rodriguez LP. Bone mineral content and density in professional tennis players. Calcif Tissue Int 1998: 62: 491–496.
- Caserotti P, Aagaard P, Larsen JB, Puggaard L. Explosive heavyresistance training in old and very old adults: changes in rapid muscle force, strength and power. Scand J Med Sci Sports 2008: 18: 773–782.
- Chow JW, Carlton LG, Lim YT, Shim JH, Chae WS, Kuenster AF. Muscle activation during the tennis volley. Med Sci Sports Exerc 1999: 31: 846–854.

- Chow JW, Knudson DV, Tillman MD, Andrew DP. Pre- and post-impact muscle activation in the tennis volley: effects of ball speed, ball size and side of the body. Br J Sports Med 2007: 41: 754–759.
- Costill DL, Coyle EF, Fink WF, Lesmes GR, Witzmann FA. Adaptations in skeletal muscle following strength training. J Appl Physiol 1979: 46: 96–99.
- Ducher G, Courteix D, Meme S, Magni C, Viala JF, Benhamou CL. Bone geometry in response to long-term tennis playing and its relationship with muscle volume: a quantitative magnetic resonance imaging study in tennis players. Bone 2005: 37: 457–466.
- Gjøvaag TF, Dahl HA. Effect of training with different intensities and volumes on muscle fibre enzyme activity and cross sectional area in the m. triceps brachii. Eur J Appl Physiol 2008: 103: 399–409.
- Gjøvaag TF, Dahl HA. Effect of training with different mechanical loadings on MyHC and GLUT4 changes. Med Sci Sports Exerc 2009: 41: 129–136.
- Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Chavarren J, Dorado C, Santana A, Serrano-Sanchez JA, Calbet JAL. Strength training

The tennis player upper extremity

combined with plyometric jumps in adults: gender differences in fat-bone axis adaptations. J Appl Physiol 2009: 106: 1100–1111.

- Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, Calbet JA. Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. PLoS ONE 2008: 3: e3466.
- Hather BM, Tesch PA, Buchanan P, Dudley GA. Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. Acta Physiol Scand 1991: 143: 177–185.
- Hilber K, Galler S, Gohlsch B, Pette D. Kinetic properties of myosin heavy chain isoforms in single fibers from human skeletal muscle. FEBS Lett 1999: 455: 267–270.
- Holm L, Reitelseder S, Pedersen TG, Doessing S, Petersen SG, Flyvbjerg A, Andersen JL, Aagaard P, Kjaer M. Changes in muscle size and MHC composition in response to resistance exercise with heavy and light loading intensity. J Appl Physiol 2008: 105: 1454–1461.
- Holzbaur KR, Murray WM, Gold GE, Delp SL. Upper limb muscle volumes in adult subjects. J Biomech 2007: 40: 742–749.
- Horowitz JF, Sidossis LS, Coyle EF. High efficiency of type I muscle fibers improves performance. Int J Sports Med 1994: 15: 152–157.
- Jansson E, Esbjornsson M, Holm I, Jacobs I. Increase in the proportion of fast-twitch muscle fibres by sprint training in males. Acta Physiol Scand 1990: 140: 359–363.
- Jurimae J, Abernethy PJ, Quigley BM, Blake K, McEniery MT. Differences in muscle contractile characteristics among bodybuilders, endurance trainers and control subjects. Eur J Appl Physiol 1997: 75: 357–362.
- Kim J, Shen W, Gallagher D, Jones A Jr, Wang Z, Wang J, Heshka S,

Heymsfield SB. Total-body skeletal muscle mass: estimation by dual-energy X-ray absorptiometry in children and adolescents. Am J Clin Nutr 2006: 84: 1014–1020.

- Kim J, Wang Z, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Gallagher D. Totalbody skeletal muscle mass: estimation by a new dual-energy X-ray absorptiometry method. Am J Clin Nutr 2002: 76: 378–383.
- Lee RC, Wang Z, Heo M, Ross R, Janssen I, Heymsfield SB. Total-body skeletal muscle mass: development and cross-validation of anthropometric prediction models. Am J Clin Nutr 2000: 72: 796–803.
- Liu Y, Schlumberger A, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM. Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training. J Appl Physiol 2003: 94: 2282–2288.
- MacDougall JD, Sale DG, Alway SE, Sutton JR. Muscle fiber number in biceps brachii in bodybuilders and control subjects. J Appl Physiol 1984: 57: 1399–1403.
- Mavidis A, Vamvakoudis E, Metaxas T, Stefanidis P, Koutlianos N, Christoulas K, Karamanlis A, Mandroukas K. Morphology of the deltoid muscles in elite tennis players. J Sports Sci 2007: 25: 1501–1506.
- Mero A, Jaakkola L, Komi PV. Relationships between muscle fibre characteristics and physical performance capacity in trained athletic boys. J Sports Sci 1991: 9: 161–171.
- Oskarsson E, Gustafsson BE, Pettersson K, Aulin KP. Decreased intramuscular blood flow in patients with lateral epicondylitis. Scand J Med Sci Sports 2007: 17: 211–215.
- Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Ara I, Vicente-Rodriguez G, Ortiz RA, Chavarren J, Calbet JA. Effects of weight lifting training

combined with plyometric exercises on physical fitness, body composition, and knee extension velocity during kicking in football. Appl Physiol Nutr Metab 2008a: 33: 501–510.

- Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez JJ, Dorado C, Calbet JA. Role of muscle mass on sprint performance: gender differences? Eur J Appl Physiol 2008b: 102: 685–694.
- Rodriguez LP, Lopez-Rego J, Calbet JA, Valero R, Varela E, Ponce J. Effects of training status on fibers of the musculus vastus lateralis in professional road cyclists. Am J Phys Med Rehabil 2002: 81: 651–660.
- Sanchis Moysi J, Dorado García C, Calbet JAL. Regional body composition in professional tennis players. In: Lees A, Maynard I, Hughes M, Reilly T, eds. Science and racket sports II. London: E. & F.N. Spon, 1998: 34–39.
- Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. Physiol Rev 1996: 76: 371–423.
- Terzis G, Georgiadis G, Vassiliadou E, Manta P. Relationship between shot put performance and triceps brachii fiber type composition and power production. Eur J Appl Physiol 2003: 90: 10–15.
- Terzis G, Stattin B, Holmberg HC. Upper body training and the triceps brachii muscle of elite cross country skiers. Scand J Med Sci Sports 2006: 16: 121–126.
- Van Gheluwe B, Hebbelinck M. Muscle actions and ground reaction forces in tennis. Int J Sports Biomech 1986: 2: 88–99.
- Yildiz Y, Aydin T, Sekir U, Kiralp MZ, Hazneci B, Kalyon TA. Shoulder terminal range eccentric antagonist/ concentric agonist strength ratios in overhead athletes. Scand J Med Sci Sports 2006: 16: 174–180.

ESTUDIO II

ORIGINAL ARTICLE

Muscle hypertrophy and increased expression of leptin receptors in the musculus triceps brachii of the dominant arm in professional tennis players

Hugo Olmedillas · Joaquin Sanchis-Moysi · Teresa Fuentes · Amelia Guadalupe-Grau · Jesus G. Ponce-González · David Morales-Alamo · Alfredo Santana · Cecilia Dorado · José A. L. Calbet · Borja Guerra

Accepted: 26 October 2009 © Springer-Verlag 2009

Abstract In rodents, endurance training increases leptin sensitivity in skeletal muscle; however, little is known about the effects of exercise on the leptin signalling system in human skeletal muscle. Thus, to determine whether chronic muscle loading increases leptin receptor (OB-R170) protein expression, body composition dual-energy X-ray absorptiometry was assessed in nine professional male tennis players (24 ± 4 years old) and muscle biopsies were obtained from the dominant (DTB) and non-dominant (NDTB) arm triceps brachii (TB), and also from the right vastus lateralis (VL). In each biopsy, the protein content of OB-R170, perilipin A, suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation were determined by western blot. The DTB had 15% greater lean mass (P < 0.05) and 62%

Communicated by Susan Ward.

H. Olmedillas · J. Sanchis-Moysi · T. Fuentes ·
A. Guadalupe-Grau · J. G. Ponce-González · D. Morales-Alamo ·
A. Santana · C. Dorado · J. A. L. Calbet (⊠) · B. Guerra
Department of Physical Education,
University of Las Palmas de Gran Canaria,
Campus Universitario de Tafira s/n,
35017 Las Palmas de Gran Canaria,
Canary Island, Spain
e-mail: lopezcalbet@gmail.com

A. Santana Genetic Unit, Childhood Hospital-Materno Infantil de Las Palmas, Avenida Marítima, del Sur s/n, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

A. Santana

Research Unit, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Bco Ballena s/n, 35013 Las Palmas de Gran Canaria, Spain greater OB-R170 protein expression (P < 0.05) than the NDTB. SOCS3 and PTP1B protein expression was similar in both arms, while STAT3 phosphorylation was reduced in the NDTB. OB-R170 protein content was also higher in DTB than in VL (P < 0.05). In summary, this study shows that the functional isoform of the leptin receptor is up-regulated in the hypertrophied TB. The latter combined with the fact that both SOCS3 and PTP1B protein expression were unaltered is compatible with increased leptin sensitivity in this muscle. Our findings are also consistent with a role of leptin signalling in muscle hypertrophy in healthy humans.

Keywords Leptin · SOCS3 · PTP1B · STAT3 · Hypertrophy · Tennis

Introduction

Leptin is a hormone produced by the adipocytes with a critical role in the regulation of appetite, energy expenditure and fat deposition (Zhang et al. 2005). Functional leptin receptors have been identified in human skeletal muscle (Fuentes et al. 2009; Guerra et al. 2007, 2008) and in vitro assays using human abdominal muscle strips have shown that in lean but not in obese subjects leptin is able to stimulate fatty acid oxidation, indicative of skeletal muscle leptin resistance in obesity (Steinberg et al. 2002). Leptin may also play a role in the regulation of muscle mass (Sainz et al. 2009). The ob/ob mouse, which does not produce leptin, and the db/db mouse, which lacks functional leptin receptors, have lower muscle mass than comparable wildtype lean mice (Madiehe et al. 2002; Trostler et al. 1979). Leptin administration to these mice promotes muscle hypertrophy (Madiehe et al. 2002; Sainz et al. 2009). However, very little is known about the influence that regular exercise has on leptin signalling in the skeletal muscle of healthy humans.

Leptin may bind to leptin receptors (OB-R), of which six OB-R isoforms have been identified (Tartaglia et al. 1995) and classified into the categories of: secreted, short and long. The secreted isoform or soluble leptin receptor (sOB-R) is mostly secreted into the bloodstream by the liver (Cohen et al. 2005) where it binds circulating leptin and regulates the concentration of free leptin (Ge et al. 2002). The short and long isoforms contain identical extracellular and transmembrane domains and differ in the length of the intracellular amino acid sequence (Tartaglia 1997; Zhang et al. 2005). Only the long isoform of the leptin receptor (OB-Rb) contains intracellular motifs required for activation of the janus kinase, the first step in leptin signalling (Tartaglia 1997).

Upon binding to the long form of its receptor (OB-Rb), leptin stimulates janus kinase 2 (JAK2), which in turn, autophosphorylates and activates the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Reduced Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation in the presence of increased leptin concentrations is indicative of leptin resistance (Hosoi et al. 2008). Leptin signalling may be attenuated by an increase of the protein suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), which blunts JAK2/STAT3-dependent leptin signalling (Bjorbaek et al. 2000) and causes leptin resistance in the skeletal muscle (Steinberg et al. 2006). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is also a negative regulator of leptin and insulin signalling (Dube and Tremblay 2005) which may be increased in skeletal muscle by inflammation (Zabolotny et al. 2008). Similarly, the activation of PTP1B, which causes dephosphorylation of the leptin receptorassociated JAK2 (Dube and Tremblay 2005), could also lead to leptin resistance.

Therefore, the purpose of this study was to determine if chronic muscle loading alters OB-R protein expression, STAT3 phosphorylation and the protein expression of SOCS3 and PTP1B as negative regulators of leptin signalling. To account for the influence of genetic, environmental, nutritional and endocrine factors that cannot be controlled for in longitudinal studies, we decided to use a unilateral loading model in humans. In so doing, we obtained muscle biopsies from the triceps brachii (TB) of the dominant (DTB) and non-dominant (NDTB) arm of tennis players. To account for the influence of muscle fibre composition on these signalling pathways, we also obtained muscle biopsies from the m. vastus lateralis (VL), which in these tennis players had a higher percentage of type 1 (2/3 of all fibres) than type 2 fibres (Sanchís-Moysi et al. 2009), compared to both TB that had a higher percentage of type 2 (2/3 of all fibres) than type 1 muscle fibres. Our hypothesis was that leptin receptors would be up-regulated in the dominant arm and/or SOCS3 and PTP1B reduced, allowing for increased leptin signalling in this muscle.

Methods

Materials

The Complete protease inhibitor and the Phospho-Stop phosphatase inhibitor cocktails were obtained from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The polyclonal rabbit anti-human leptin receptor antibody that recognizes three isoforms of the human leptin receptor present in skeletal muscle (Guerra et al. 2007) was obtained from Linco Research (St Charles, MO, USA). The polyclonal rabbit anti-perilipin A antibody was kindly provided by Dr Andrew S. Greenberg. The polyclonal rabbit anti-human SOCS3 antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The polyclonal rabbit anti-Tyr⁷⁰⁵-STAT3 and the monoclonal mouse anti-STAT3 antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The monoclonal mouse anti-PTP1B was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The monoclonal mouse anti-alpha-tubulin antibody was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit and donkey anti-mouse antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). The Hybond-P transfer membranes, Hyperfilm ECL and the ECL plus Western Blotting Detection System were from Amersham Biosciences (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The ChemiDoc XRS System and the image analysis software Quantity One[©] were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK).

Subjects

Nine male tennis players aged 24 ± 4 (mean \pm SD) agreed to participate in this investigation (Table 1). Written informed consent was obtained from each subject after they received a full explanation of the nature and the possible risks associated with the study procedures. The study was approved by the ethical committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria. All subjects began tennis practice before 12 years of age and had been trained and participated in professional tennis competitions of the International Tennis Federation (Futures and Challengers tournaments).

Assessment of body composition

Body composition was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (Hologic QDR-1500, Hologic Corp., software version 7.10, Waltham, MA, USA) as described elsewhere (Perez-Gomez et al. 2008a, b). The lean mass of the extremities was assumed to be equivalent to the muscle mass (Calbet et al. 1998; Kim et al. 2006). From the whole

 Table 1
 Body composition, basal plasma glucose and endocrine variables

	Mean \pm SD
Age (years)	24.1 ± 3.6
Height (cm)	181.9 ± 8.5
Body mass (kg)	75.8 ± 9
% Body fat	11.8 ± 6.7
Lean mass DA (g)	$3,643 \pm 407$
Lean mass NDA (g)	$3,168 \pm 359*$
Leptin (ng ml $^{-1}$)	1.9 ± 2.3
Glucose (mmol l^{-1})	5.0 ± 0.1
Insulin (pmol l^{-1})	6.0 ± 1.9
HOMA (mmol l^{-1})	1.3 ± 0.1

DA dominant arm, NDA non-dominant arm

* P < 0.05 DA versus NDA

body scans, the percentage of body fat (%) was also determined.

Muscle biopsies

On a different day, subjects reported to the laboratory at 8.00 after an overnight fast. After 10 min rest in the supine position, a venous blood sample was obtained and the skin over the lateral aspect of both TB (short head) and the middle portion of the VL was anaesthetized with 2% lidocaine. Thereafter, muscle biopsies were obtained using the Bergstrom technique as described elsewhere (Guadalupe-Grau et al. 2009). The muscle specimens were cleaned to remove any visible blood, fat and connective tissue. The muscle tissue was then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C for later analysis.

Assessment of insulin resistance

In each subject, the degree of insulin resistance was estimated by the homeostasis model assessment (HOMA) according to the method described by Matthews et al. (1985). In brief, fasting plasma insulin and fasting plasma glucose values were used to calculate an index of insulin resistance. The HOMA index was calculated as fasting insulin concentration (μ U ml⁻¹) × fasting glucose concentration (mmol l⁻¹)/22.5, assuming that normal young subjects have an insulin resistance of 1.

Total protein extraction, electrophoresis and western blot analysis

For total protein extraction from human skeletal muscle, a piece of frozen tissue was homogenized as described elsewhere (Guerra et al. 2007). After centrifugation at 20,000*g* to remove tissue debris, total protein extracts were

transferred to clean tubes and an aliquot of each extract was preserved for protein quantification by the bicinchoninic acid assay (Smith et al. 1985). Proteins were solubilized in sample buffer containing 0.0625 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% [w/v] sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% [v/v] glycerol, 5% [v/v] β -mercaptoethanol and 0.001% [w/v] bromophenol blue. Equal protein amounts (50 µg) of each sample were electrophoresed on 7.5-10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis using the system of Laemmli (1970) and transferred to Hybond-P membranes according to the method of Towbin et al. (1979). For immunoblotting, membranes were pre-incubated with 5% blotting grade blocker non-fat dry milk (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in Tris-buffered saline (TBS) with 0.1% Tween 20 (blotto blocking buffer) for 1 h at room temperature (20-22°C). To detect the leptin receptor isoforms (OB-Rs), membranes were incubated with a rabbit polyclonal-specific anti-human OB-R (long form) antibody. To detect SOCS3 protein expression, membranes were incubated with a rabbit polyclonal-specific antihuman SOCS3 antibody. To detect PTP1B protein expression, membranes were incubated with a mouse monoclonal-specific anti-human PTP1B antibody. To detect Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation, membranes were incubated with a rabbit polyclonal antibody that recognizes this kinase only when the residue Tyr⁷⁰⁵ is phosphorylated. To detect total STAT3, membranes were incubated with a mouse monoclonal antibody that recognizes the total form (phosphorylated and non-phosphorylated) of this kinase. To control for differences in loading and transfer efficiency across membranes, an antibody directed against alphatubulin was used to hybridize on the same samples. Membrane incubations with polyclonal rabbit anti-OB-R (diluted 1:1,500 in blotto blocking buffer), polyclonal rabbit anti-Tyr⁷⁰⁵-STAT3 [diluted 1:500 in 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS with 0.1% Tween 20 (BSA blocking buffer)], monoclonal mouse anti-STAT3 (diluted 1:750 in BSA blocking buffer) and the monoclonal mouse anti-PTP1B (diluted 5:1,000 in blotto blocking buffer) were performed overnight at 4°C. Membrane incubations with polyclonal rabbit anti-SOCS3 (diluted 1:500 in blotto blocking buffer) and with monoclonal mouse anti-alphatubulin (diluted 1:50,000 in blotto blocking buffer) were performed for 1 h at room temperature. To control for the presence of adipose tissue protein in the muscle extract, a polyclonal rabbit anti-perilipin A antibody was used (Guerra et al. 2007; Wang et al. 2003). To explore the expression of this protein in human skeletal muscle, membranes were blocked with BSA blocking buffer for 1 h at room temperature. Membrane incubations with polyclonal rabbit anti-perilipin A antibody (diluted 1:1,500 in BSA blocking buffer) were performed for 1 h at room temperature. Antibody-specific labelling was revealed by incubation

with an HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:20,000) or an HRP-conjugated donkey anti-mouse (1:10,000) antibody both diluted in blotto blocking buffer. Specific bands were visualized with the ECL chemiluminescence kit (Amersham Biosciences), visualized with the ChemiDoc XRS system (Bio-Rad Laboratories) and analysed with the image analysis program Quantity one (Bio-Rad Laboratories). The densitometry analysis was carried out immediately before saturation of the immunosignal. Data are reported as band intensity of immunostaining values (arbitrary units) obtained for OB-R, Perilipin, SOCS3 or PTP1B relative to those obtained for alpha-tubulin. Alpha-tubulin and total STAT3 protein contents in the DTB, NDTB and VL muscle were similar (data not shown, P > 0.05). Western blots were always performed in triplicate with a variation coefficient less than 10%. Samples from the same subject were run in the same gel.

Leptin assays

Serum leptin was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELx800 Universal Microplate Reader, Bioteck Instruments Inc, Winooski, VT, USA), using reagent kits from Linco Research (#EZHL-80SK, Linco Research, St Charles, MO, USA) following the manufacturer's instructions. The sensitivity of the total leptin assays was 0.05 ng ml⁻¹. The intra-assay coefficient of variation was 3.8% and the inter-assay coefficient of variation was 4.4%.

Statistical analysis

Comparisons between biopsies were performed using ANOVA for repeated measures with post hoc comparisons carried out using the Fisher's LSD test. Since the dominant TB OB-R98 and PTP1B did not follow a Gaussian distribution, they were logarithmically transformed. Side-to-side differences in tissue composition were analysed using paired Student's *t* test. Correlations between variables were determined by calculating the Pearson's correlation coefficient. Results are presented as mean \pm SD, except on the bar figures which are presented as mean \pm SE of the mean. Data were analysed using the SPSS statistical program (SPSS 14.0 Inc., Chicago, IL, USA). Statistical significance level was set at *P* < 0.05.

Results

Dual-energy X-ray absorptiometry

Body composition and anthropometrics are reported in Table 1. The lean mass of the dominant arm was 15.0% greater than that of the contralateral arm $(3,643 \pm 407 \text{ versus})$

3,168 \pm 359 g, *P* < 0.001). However, the lean mass of both lower extremities was similar (10,351 \pm 1,294 versus 10,239 \pm 1,123g, right and left legs, respectively, *P* = 0.49).

Serum leptin concentrations, glucose, insulin and HOMA

Serum leptin, insulin and glucose concentrations as well as HOMA are reported in Table 1. Serum leptin correlated with the percentage of fat in arms, limbs, trunk and whole body (r = 0.88, 0.99, 0.96 and 0.99, all P < 0.01 respectively).

Between-arm differences

The protein expression of the long isoform of the leptin receptor was 62% greater in DTB than in NDTB (Figs. 1a, 2a) (P < 0.05). Between-arm differences in OB-R128 (P = 0.28) and OB-R98 (P = 0.36) did not reach statistical significance (Figs. 1a, 2b, c, respectively). Perilipin A content was similar in both arms, indicating a similar degree of contamination by protein coming from adipocytes in the biopsies from both TB (P = 0.36) (data not shown).

Suppressor of cytokine signalling 3 (Figs. 1d, 3b) (P = 0.34) and PTP1B (Figs. 1e, 3c) (P = 0.57) protein



Fig. 1 Representative western blot assays to determine leptin receptor (OB-R), STAT3, SOCS3, PTP1B and alpha-tubulin protein expression and the pTyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation level in the triceps brachii from the dominant arm (DTB), non-dominant arm (NDTB) and from the vastus lateralis (VL). a Representative immunoblot assay after incubation with a polyclonal rabbit anti-OB-R antibody specifically raised against the long isoform. b Representative western blot after incubation with a polyclonal rabbit anti-pTyr705-STAT3 antibody in the same samples used in A. c Representative western blot after incubation with a monoclonal mouse anti-STAT3 antibody in the same samples used in A. d Representative western blot after incubation with a polyclonal rabbit anti-SOCS3 antibody in the same samples used in A. e Representative western blot after incubation with a monoclonal mouse anti-PTP1B antibody in the same samples used in A. f Representative western blot after incubation with a monoclonal mouse antialpha-tubulin antibody in the same samples used in a



Fig. 2 Determination of the leptin receptor (OB-R) protein expression in the *triceps brachii* from the dominant arm (*DTB*), non-dominant arm (*NDTB*) and from the *vastus lateralis* (*VL*). **a** Densitometric immunosignal values (arbitrary units of band densities) of OB-R170 bands relative to those obtained for alpha-tubulin. **b** Densitometric immunosignal values (arbitrary units of band densities) of OB-R128 bands relative to those obtained for alpha-tubulin. **c** Densitometric immunosignal values (arbitrary units of band densities) of OB-R98 bands relative to those obtained for alpha-tubulin. **P* < 0.05 versus DTB

expression as well as Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation (Figs. 1b, 3a) (P = 0.50) were similar in both arms. A correlation matrix is presented in Table 2. In the DTB, there was a correlation between leptin and leptin receptors. However, in the NDTB and VL, there was no correlation between leptin and leptin receptors. Leptin correlated with SOCS3 in the NDTB (r = 0.73, P < 0.05). PTP1B was inversely related to leptin (r = -0.78, P < 0.05) in the DTB.

Comparison between *vastus lateralis* and both triceps brachii

OB-R128 (Figs. 1a, 2b), OB-R98 (Figs. 1a, 2c), Perilipin A (data not shown), SOCS3 (Figs. 1d, 3b) and PTP1B protein expression (Figs. 1e, 3c) were similar in the three muscles. However, OB-R170 protein content was higher in the DTB



Fig. 3 Determination of pTyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation level and SOCS3 and PTP1B protein expression in the *triceps brachii* from the dominant arm (*DTB*), non-dominant arm (*NDTB*) and from the *vastus lateralis* (*VL*). **a** Densitometric analysis of pTyr⁷⁰⁵-STAT3 immunoblot (arbitrary units of band densities). Values are relative to total STAT3. **b** Densitometric immunosignal values (arbitrary units of band densities) of SOCS3 bands relative to those obtained for alpha-tubulin. **c** Densitometric immunosignal values (arbitrary units of band densities) of PTP1B bands relative to those obtained for alpha-tubulin. $^{\&}P < 0.05$ versus NDTB

compared to the VL (P < 0.05), and similar in NDTB and VL (Figs. 1a, 2a). Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation level was 2.3-fold higher in the VL than in the NDTB (P < 0.05) (Figs. 1b, 3a).

Discussion

In agreement with our hypothesis, this study shows that chronic muscle loading causing muscle hypertrophy is associated with up-regulation of the long isoform, i.e. the functionally active form, of the leptin receptor. Moreover, basal Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation was reduced in the NDTB compared to the m. *vastus lateralis*, indicating that unloaded (or less loaded) muscles may have reduced STAT3

 Table 2
 Correlation matrix

		OB-R170	OB-R128	LgOB-R98	SOCS3	pSTAT3	LgPTP1B
Dominant mus	culus ta	riceps brachii					
Leptin	r	0.78	0.80	0.81	-0.55	0.00	-0.78
	P	0.01	0.01	0.008	0.12	1.00	0.02
OB-R170	r		0.78	0.71	-0.50	-0.002	0.83
	Р		0.01	0.03	0.17	1.00	0.01
OB-R128	r			0.93	-0.56	-0.14	0.87
	Р			0.001	0.11	0.71	0.005
LgOB-R98	r				-0.73	-0.16	0.74
	Р				0.03	0.78	0.04
SOCS3	r					-0.15	-0.61
	Р					0.70	0.11
pSTAT3	r						0.13
	Р						0.76
		OB-R170	OB-R128	OB-R98	SOCS3	pSTAT3	PTP1B
Non-dominant	muscu	lus triceps brad	chii				
Leptin	r	0.00	0.05	0.17	0.73	-0.22	0.14
1	Р	0.99	0.90	0.66	0.03	0.58	0.74
OB-R170	r		0.15	0.11	0.29	0.47	-0.14
	Р		0.70	0.78	0.45	0.20	0.75
OB-R128	r			0.38	-0.31	-0.35	-0.26
	Р			0.31	0.41	0.35	0.54
OB-R98	r				-0.30	-0.34	-0.47
	Р				0.43	0.36	0.24
SOCS3	r					0.17	0.21
	Р					0.66	0.61
pSTAT3	r						-0.26
	Р						0.53
		OB-R170	OB-R128	OB-R98	SOCS3	pSTAT3	PTP1B
Musculus vasta	ıs later	calis					
Leptin	r	-0.28	-0.10	-0.51	-0.56	-0.38	0.34
	Р	0.46	0.80	0.17	0.12	0.31	0.37
OB-R170	r		0.60	0.44	0.01	0.10	0.05
	Р		0.09	0.24	0.98	0.81	0.91
OB-R128	r			0.52	-0.02	0.08	-0.48
	Р			0.15	0.97	0.83	0.19
OB-R98	r				0.79	0.49	-0.48
	Р				0.01	0.18	0.19
SOCS3	r					0.51	-0.43
	Р					0.16	0.25
pSTAT3	r						-0.67
	Р						0.05

LgOB-R98 logarithm of OB-R98, *LgPTP1B* logarithm of PTP1B

phosphorylation under basal conditions, which is compatible with reduced leptin signalling. This study also shows that SOCS3 and PTP1B protein expression are similar in the three muscles analysed, indicating that muscle loading has little effect on the basal concentrations of these proteins in skeletal muscle at least in healthy physically active humans. In agreement with our previous study, there was no relationship between leptin concentration and SOCS3 protein expression in the VL (Guerra et al. 2008). However, there was a positive association between leptin and SOCS3 in the non-dominant triceps (r = 0.73). This suggests that other factors dominate over leptin to regulate SOCS3 in loaded

muscles. This may be necessary, since an increase in SOCS3 could limit protein synthesis in the muscle (Leger et al. 2008). What is clear is that correlations appear to be different in the loaded TB compared to the unloaded TB, but also in the loaded TB and the loaded VL implying that this signalling system in skeletal muscles is affected by loading depending on the muscle fibre type composition.

Very little is known about the regulation of the expression of leptin receptors in human skeletal muscles. Leptin, insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), testosterone and estradiol are among the known regulators of OB-R expression, but the effects of circulating hormones on OB-R expression show tissue specificity (Alonso et al. 2007; Garofalo et al. 2006; Hikita et al. 2000; Ishikawa et al. 2007; Liu et al. 2007). For example, leptin administration at high doses to cultures of hepatic stellate cells stimulates OB-R expression (Tang et al. 2009). In human skeletal muscle, OB-Rb protein expression in the musculus VL is almost twice as high in women as in men (Guerra et al. 2008). However, OB-Rb protein content is reduced in the VL and deltoid muscle of obese humans compared to nonobese controls (Fuentes et al. 2009). In this study, we found a positive correlation between OB-Rb and circulating leptin in the loaded TB, which was absent in the other two muscles. Thus, muscle loading facilitates the expression of leptin receptors when accompanied by muscle hypertrophy, at least in muscles with a high proportion of type 2 fibres, as in the TB (Sanchís-Moysi et al. 2009).

It has also been shown that oxidative stress may contribute to stimulate OB-R expression in hepatic stellate cell cultures (Tang et al. 2009). Since both the TB and the VL are subjected to exercise-induced oxidative stress, other factors must also stimulate OB-Rb expression in the hypertrophied human TB. Another possible mechanism that could explain the upregulation of OB-R is related to the process of muscle hypertrophy. In breast cancer cell lines, immunoprecipitation of OB-R with subsequent immunoblotting for IGF-I receptor (IGF-IR) showed that OB-Rb is pulled down with IGF-IR and that IGF-IR immunoprecipitation pulled down OB-Rb (Ozbay and Nahta 2008). These experiments suggested that at least in cancer cells IGF-IR and OB-Rb interact. Moreover, IGF is able to induce OB-Rb phosphorylation by IGR-IR kinase which is activated upon IGF binding to IGF-IR (Ozbay and Nahta 2008). However, leptin cannot signal through IGF-IR (Ozbay and Nahta 2008). Muscle contraction and stretching stimulate IGF-I and II production in skeletal muscles which by an autocrine mechanism promote muscle hypertrophy (Adams and McCue 1998; Goldspink 1999; Matheny et al. 2009). Since IGF-I is able to stimulate OB-Rb expression, at least in breast cancer cell lines (Garofalo et al. 2006), it is likely that at the same time it elicits an increase in OB-Rb expression also in the skeletal muscles. However, this hypothesis needs to be verified experimentally.

As previously reported (Sanchís-Moysi et al. 2009), type 2 muscle fibres were predominantly hypertrophied in the DTB, and type 1 muscle fibres in the m. *vastus lateralis*. Thus, this could indicate that the increase in OB-Rb protein expression in loaded muscles is mostly occurring in the hypertrophied type 2 muscle fibres. Unfortunately, it was not possible to carry out immunohistochemical experiments to confirm this indirect finding.

It should be taken into consideration that STAT3 is the signal transducer of numerous stimuli in addition to leptin (Stepkowski et al. 2008). Serrano et al. (2008) have shown that interleukin-6 (IL-6) is necessary for satellite cell-mediated muscle hypertrophy by a Tyr⁷⁰⁵-STAT3-dependent mechanism. IL-6 is produced locally by skeletal muscle fibres in response to muscle contraction (Hiscock et al. 2004; Steensberg et al. 2000) and lengthening (McKay et al. 2009), and also in response to reactive oxygen species (Fischer et al. 2004). The exercise-induced muscle IL-6 production is accentuated after resistance training when the weight-lifting exercise is performed at the same relative intensity (Izquierdo et al. 2009). It has also been reported that in the m. vastus lateralis an increase of Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation (and SOCS3 mRNA) occurs 2 h after a strength training session that is normalized by 4 h into the recovery period (Trenerry et al. 2007).

In the present investigation, Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation was similar in the dominant TB and in m. vastus lateralis; however, it was reduced in the NDTB compared to m. vastus lateralis (the comparison between the DTB and NDTB did not reach statistical significance due to the high variability observed in the dominant arm). This betweenmuscle difference in Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation could be explained by lower local production of IL-6 in unloaded muscles. Exercise-induced IL-6 production mainly occurs in type 2 fibres (Hiscock et al. 2004). Despite the fact that our subjects had a similar proportion of type 2 fibres in both TB and a lower amount of type 2 fibres in their m. vastus lateralis (Sanchís-Moysi et al. 2009), Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation was similar in their loaded TB and in their m. vastus lateralis (also a loaded muscle). Thus, the present investigation shows that basal Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation is increased in the trained muscle regardless of its fibre type composition.

Another interesting aspect of this study is that our Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation results are consistent with the known increase in muscle oxidative profile with exercise training (Gollnick et al. 1973): VL (predominantly composed by type 1 fibres) expressing a greater Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation to OB-Rb abundance than the DTB (predominantly composed by type 2 fibres) expressing larger receptor abundance but similar albeit variable Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation. These data indicate that there is no need for high levels of leptin receptors in the

trained leg muscle that has increased Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation (compatible with effective leptin signalling). In the untrained TB, leptin-SOCS3 feedback loop appears to be active, given the correlation observed between these two variables, and leptin sensitivity may be reduced compared to the contralateral trained muscle. In contrast, in the trained TB, leptin signalling is facilitated by the elevated content of leptin receptors combined with lack of elevation of either SOCS3 or PTP1B. This is opposite to what is observed in the VL and *deltoid* muscles of obese humans, who have reduced OB-Rb content and leptin resistance (Fuentes et al. 2009).

It remains to be determined what function the up-regulation of OB-Rb subserves in the hypertrophied human skeletal muscle: is OB-Rb involved in skeletal muscle hypertrophy in response to mechanical loading? Indirect evidence lends support for such a possibility. For example, the ob/ob mouse, which does not produce leptin, and the db/db mouse, which lacks functional leptin receptors, both have lower muscle mass than comparable wild-type lean mice, despite ob/ob and db/db mice weighing twice as much as lean mice (Madiehe et al. 2002; Trostler et al. 1979). Leptin administration, even to db/db mice strains, promotes muscle growth by a mechanism likely mediated by short OB-R isoforms (Madiehe et al. 2002). Likewise, muscle accretion in response to leptin treatment has been recently reported in ob/ob mice (Sainz et al. 2009). Thus, an increased OB-Rb expression in overloaded skeletal muscle may facilitate muscle growth by a mechanism involving leptin signalling through JAK2/PIK3/Akt (Maroni et al. 2005), elicited either by leptin itself or by IGF-I. In contrast, Warmington et al. (2000) reported no effect of leptin treatment on muscle mass and morphology in ob/ob mice, despite reducing body mass. Moreover, treatment with low and high doses of leptin (without changes in mechanical loading) does not increase lean body mass in humans with human immunodeficiency virus-associated lipoatrophy and hypoleptinemia (Mulligan et al. 2009). Perhaps, the theoretical pro-hypertrophic effect of leptin is only observed when the action of leptin is combined with mechanical loading. This notion is supported by human cross-sectional studies showing an association between hypertensioninduced cardiac hypertrophy and plasma leptin concentration (Paolisso et al. 1999). However, in cardiac myocytes from ob/ob mice, leptin has been reported to have antihypertrophic effects in pressure overloaded hearts (Mascareno et al. 2009).

Another possible role for the increase in OB-Rb in the loaded m. *triceps brachii* is to facilitate leptin signalling in this muscle to increase the capacity to oxidize fat to cope with the increased energy demand caused by tennis participation. However, this hypothetical explanation should be tested in future studies.

In summary, this study shows that TB hypertrophy is accompanied by up-regulation of the functional isoform of the leptin receptor. Given the cross-talk between IGF-I signalling and leptin signalling, this finding is compatible with a role for leptin signalling in muscle hypertrophy in healthy humans. Since hypertrophy occurred predominantly in type 2 fibres in the loaded TB and in type 1 fibres in the VL, our findings are consistent with a greater increase in OB-Rb content in hypertrophied type 2 muscle fibres. We have also shown that SOCS3 and PTP1B protein expression in skeletal muscle is similar in both TB and VL, implying that muscle loading has little influence on the basal expression of these two negative regulators of leptin signalling in the healthy human. In contrast, muscle loading appears to increase Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation similarly in slow and fast muscle fibres. These results are compatible with increased leptin sensitivity in the hypertrophied skeletal muscles.

Acknowledgements The authors wish to thank Dr Andrew S. Greenberg for kindly providing the anti-perilipin A antibody. Special thanks are given to José Navarro de Tuero for his excellent technical assistance and to Robert Boushel for his critical review of the manuscript. The authors wish to thank all the tennis players who volunteered in these studies. Special thanks are given to Sánchez-Casal Tennis Academy, and particularly to Emilio Sánchez Vicario for his crucial collaboration. This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-13784 and FEDER) and Gobierno de Canarias (PI2005/177) and FUNCIS PI10/07. Borja Guerra is a fellow of the "Recursos Humanos y Difusión de la Investigación" Program (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

References

- Adams GR, McCue SA (1998) Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. J Appl Physiol 84:1716–1722
- Alonso A, Fernandez R, Moreno M, Ordonez P, Diaz F, Gonzalez C (2007) Leptin and its receptor are controlled by 17beta-estradiol in peripheral tissues of ovariectomized rats. Exp Biol Med (Maywood) 232:542–549
- Bjorbaek C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG Jr (2000) SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. J Biol Chem 275:40649–40657
- Calbet JA, Moysi JS, Dorado C, Rodriguez LP (1998) Bone mineral content and density in professional tennis players. Calcif Tissue Int 62:491–496
- Cohen P, Yang G, Yu X, Soukas AA, Wolfish CS, Friedman JM, Li C (2005) Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation. J Biol Chem 280:10034–10039
- Dube N, Tremblay ML (2005) Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. Biochim Biophys Acta 1754:108–117
- Fischer CP, Hiscock NJ, Penkowa M, Basu S, Vessby B, Kallner A, Sjoberg LB, Pedersen BK (2004) Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. J Physiol 558:633–645
- Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, Helge JW, Calbet JA, Guerra B (2009) Leptin

receptor 170 KDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. Exp Physiol. doi:10.1113/expphysiol.2009.049270

- Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, Russo A, Sulkowski S, Surmacz E (2006) Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. Clin Cancer Res 12:1447–1453
- Ge H, Huang L, Pourbahrami T, Li C (2002) Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. J Biol Chem 277:45898–45903
- Goldspink G (1999) Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. J Anat 194(Pt 3):323–334
- Gollnick PD, Armstrong RB, Saltin B, Saubert CW 4th., Sembrowich WL, Shepherd RE (1973) Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. J Appl Physiol 34:107–111
- Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Chavarren J, Dorado C, Santana A, Serrano-Sanchez JA, Calbet JA (2009) Strength training combined with plyometric jumps in adults: sex differences in fat-bone axis adaptations. J Appl Physiol 106:1100–1111
- Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C, Calbet JA (2007) Leptin receptors in human skeletal muscle. J Appl Physiol 102:1786–1792
- Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, Calbet JA (2008) Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. PLoS ONE 3:e3466
- Hikita M, Bujo H, Hirayama S, Takahashi K, Morisaki N, Saito Y (2000) Differential regulation of leptin receptor expression by insulin and leptin in neuroblastoma cells. Biochem Biophys Res Commun 271:703–709
- Hiscock N, Chan MH, Bisucci T, Darby IA, Febbraio MA (2004) Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. FASEB J 18:992–994
- Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K (2008) Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. Mol Pharmacol 74:1610–1619
- Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M (2007) Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. Andrologia 39:22–27
- Izquierdo M, Ibanez J, Calbet JA, Navarro-Amezqueta I, Gonzalez-Izal M, Idoate F, Hakkinen K, Kraemer WJ, Palacios-Sarrasqueta M, Almar M, Gorostiaga EM (2009) Cytokine and hormone responses to resistance training. Eur J Appl Physiol 107(4):397–409
- Kim J, Shen W, Gallagher D, Jones A Jr, Wang Z, Wang J, Heshka S, Heymsfield SB (2006) Total-body skeletal muscle mass: estimation by dual-energy X-ray absorptiometry in children and adolescents. Am J Clin Nutr 84:1014–1020
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685
- Leger B, Derave W, De Bock K, Hespel P, Russell AP (2008) Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. Rejuvenation Res 11:163B–175B
- Liu ZJ, Bian J, Liu J, Endoh A (2007) Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. Horm Metab Res 39:489–494
- Madiehe AM, Hebert S, Mitchell TD, Harris RB (2002) Strain-dependent stimulation of growth in leptin-treated obese db/db mice. Endocrinology 143:3875–3883
- Maroni P, Bendinelli P, Piccoletti R (2005) Intracellular signal transduction pathways induced by leptin in C2C12 cells. Cell Biol Int 29(7):542–550

- Mascareno E, Beckles D, Dhar-Mascareno M, Siddiqui MA (2009) Enhanced hypertrophy in ob/ob mice due to an impairment in expression of atrial natriuretic peptide. Vascul Pharmacol 51:198–204
- Matheny W, Merritt E, Zannikos SV, Farrar RP, Adamo ML (2009) Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. Exp Biol Med (Maywood) 234:164–170
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 28:412–419
- McKay BR, De Lisio M, Johnston AP, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G (2009) Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following musclelengthening contractions in humans. PLoS ONE 4:e6027
- Mulligan K, Khatami H, Schwarz JM, Sakkas GK, DePaoli AM, Tai VW, Wen MJ, Lee GA, Grunfeld C, Schambelan M (2009) The effects of recombinant human leptin on visceral fat, dyslipidemia, and insulin resistance in patients with human immunodeficiency virus-associated lipoatrophy and hypoleptinemia. J Clin Endocrinol Metab 94:1137–1144
- Ozbay T, Nahta R (2008) A novel unidirectional cross-talk from the insulin-like growth factor-I receptor to leptin receptor in human breast cancer cells. Mol Cancer Res 6:1052–1058
- Paolisso G, Tagliamonte MR, Galderisi M, Zito GA, Petrocelli A, Carella C, de Divitiis O, Varricchio M (1999) Plasma leptin level is associated with myocardial wall thickness in hypertensive insulin-resistant men. Hypertension 34:1047–1052
- Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Royo IA, Vicente-Rodriguez G, Ortiz RA, Chavarren J, Calbet JA (2008a) Effects of weight lifting training combined with plyometric exercises on physical fitness, body composition, and knee extension velocity during kicking in football. Appl Physiol Nutr Metab 33:501–510
- Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez JJ, Dorado C, Calbet JA (2008b) Role of muscle mass on sprint performance: gender differences? Eur J Appl Physiol 102:685–694
- Sainz N, Rodriguez A, Catalan V, Becerril S, Ramirez B, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G (2009) Leptin administration favors muscle mass accretion by decreasing FoxO3a and increasing PGC-1alpha in ob/ob mice. PLoS ONE 4:e6808
- Sanchís-Moysi J, Idoate F, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Alayón S, Carreras A, Dorado C, Calbet JAL (2009) The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, inter-arm asymmetry and muscle fiber type distribution. Scand J Med Sci Sports. doi:10.1111/j.1600-0838.2009.00969.x
- Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardi M, Munoz-Canoves P (2008) Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cellmediated skeletal muscle hypertrophy. Cell Metab 7:33–44
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150:76–85
- Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B (2000) Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6 [In Process Citation]. J Physiol 529(Pt 1):237–242
- Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ (2002) Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab 283:E187–E192
- Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D, Kemp BE (2006) The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured

skeletal muscle of obese humans. J Clin Endocrinol Metab 91:3592-3597

- Stepkowski SM, Chen W, Ross JA, Nagy ZS, Kirken RA (2008) STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions. Transplantation 85:1372–1377
- Tang Y, Zheng S, Chen A (2009) Curcumin eliminates leptin's effects on hepatic stellate cell activation via interrupting leptin signaling. Endocrinology 150(7):3011–3020
- Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. J Biol Chem 272:6093-6096
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell 83:1263–1271
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76:4350–4354

- Trenerry MK, Carey KA, Ward AC, Cameron-Smith D (2007) STAT3 signaling is activated in human skeletal muscle following acute resistance exercise. J Appl Physiol 102:1483–1489
- Trostler N, Romsos DR, Bergen WG, Leveille GA (1979) Skeletal muscle accretion and turnover in lean and obese (ob/ob) mice. Metabolism 28:928–933
- Wang Y, Sullivan S, Trujillo M, Lee MJ, Schneider SH, Brolin RE, Kang YH, Werber Y, Greenberg AS, Fried SK (2003) Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot. Obes Res 11:930–936
- Warmington SA, Tolan R, McBennett S (2000) Functional and histological characteristics of skeletal muscle and the effects of leptin in the genetically obese (ob/ob) mouse. Int J Obes Relat Metab Disord 24:1040–1050
- Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB (2008) Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. J Biol Chem 283:14230–14241
- Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R (2005) Leptin: structure, function and biology. Vitam Horm 71:345–372

ESTUDIO III

Concurrent strength and endurance training, leptin receptors and SOCS3 protein expression in the human vastus lateralis.

Hugo Olmedillas¹, Borja Guerra¹, Amelia Guadalupe-Grau¹, Alfredo Santana^{1,2,3}, Teresa Fuentes¹, Cecilia Dorado¹, José A Serrano-Sanchez¹, Jose A L Calbet¹

¹ Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain.

² Genetic Unit, Childhood Hospital-Materno Infantil de Las Palmas, Avenida Marítima, del Sur s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35016, Spain.

³ Research Unit, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Bco Ballena s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35013, Spain

Keywords: Leptin receptors, SOCS3, resistance training

Running title: Resistance training and leptin receptors

Correspondence to:

Jose A L Calbet

Departamento de Educación Física, Campus Universitario de

Tafira,

35017 Las Palmas de Gran Canaria, Canary Island, Spain.

Tel: 0034 928 458 896

Fax: 0034 928 458 867

email: lopezcalbet@gmail.com

Abstract

Endurance exercise induces SOCS3 mRNA expression in rodent skeletal muscle and endurance training overimposed on strength training blunts the hypertrophic response to strength training. To determine the effects of a concurrent strength and endurance training on fat mass, serum leptin concentration, muscle morphology, and musculus vastus lateralis leptin receptors (OB-Rb) and the protein suppressor of cytokine signaling 3 SOCS3 protein expression. Sixteen healthy policemen were assigned to a control (C; n=8), and to a 12-week weightlifting (3 sessions/week) + endurance training program (T; n=9) group. Training enhanced maximal dynamic strength in lower and upper body exercises (18-54%), reduced fat mass by 1.8 kg and serum leptin concentration per kg of fat mass, and elicited muscle hypertrophy of type 2 (+18.5%, P<0.05) but not of type 1 muscle fibers. Not significant changes were observed in either OB-Rb or SOCS3 protein expression with training. In conclusion, concurrent strength and endurance training reduces fat mass and serum leptin and the ratio leptin/fat mass without significant effects on vastus lateralis OB-Rb protein expression. Training does not increase the basal expression of SOCS3 protein in humans. Finally, performing endurance training immediately after strength training blunts the hypertrophic response to training of type 1 muscle fibers.

Introduction

Leptin is a hormone mainly released by the adipose tissue with a crucial role in the regulation of appetite, basal metabolic rate and fat deposition (56). Leptin acts by binding to six subtypes (isoforms) of leptin receptors (OB-R) ubiquitously present in many tissues and cells. The long or signaling isoform of the leptin receptor (OB-Rb) is expressed in human skeletal muscle (11, 18, 19). The main effect of leptin in skeletal muscle is thought to be the stimulation of fat oxidation (9, 38). There is also some evidence in support for a role of leptin in regulation of muscle mass. For example, leptin administration to the ob/ob mouse, which does not produce leptin, and to the db/db mouse, which lacks of functional leptin receptors promotes muscle hypertrophy (Madiehe et al. 2002; Sainz et al. 2009). Moreover, in tennis players, we have recently observed an increased expression of OB-Rb in the hypertrophied musculus *triceps brachii* compared to the contralateral arm (Olmedillas et al., unpublished). It remains unknown, however, if muscle loading enhances the protein expression of OB-Rb and if this increase in OB-Rb protein is necessary for muscle hypertrophy to occur. The fact that ob/ob and db/db mice have reduced muscle mass (Madiehe et al. 2002; Sainz et al. 2009) despite a remarkable increase in body mass points in this direction. Moreover, it has been shown that leptin, like insulin-like growth factor 1 (IGF-1), is able to signal through activation of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), as well as various cytokines involved in the regulation of protein synthesis in skeletal muscle (20).

The main negative regulator of leptin action in skeletal muscle is the protein suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), which is induced by leptin itself, cytokines (26) and growth hormone (15). Endurance exercise induces SOCS3 mRNA in rodent skeletal muscle (48) and resistance exercise increases SOCS3 protein expression 2 hour after cessation of exercise in young men (52). It remains unknown what effect has chronic overloading in the basal SOCS3 protein expression of healthy humans submitted to concurrent strength and endurance training.

It is hypothesised that concurrent strength and endurance training will elicit a reduction of circulating leptin, down-regulation of leptin receptors in skeletal muscle and blunted muscle hypertrophy associated to increased basal SOCS3 protein expression. This hypothesis is based on studies showing that overexpression of SOCS3 reduces cardiac myocyte hypertrophy in rodents (54) and that increased levels of SOCS3 protein have been associated to sarcopenia in humans (33).

Therefore, the aim of this investigation was to determine the effects of a training program combining strength and endurance training on fat mass, serum leptin concentration skeletal muscle leptin receptors and SOCS3 protein expression. Since endurance training may blunt the hypertrophic response to
strength training we also aimed at determining if such a response could elicited by increased SOCS3 protein expression in the trained muscles.

Methods

Materials

The Complete protease inhibitor and the Phospho-Stop phosphatase inhibitor cocktails were obtained from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The polyclonal rabbit anti-human leptin receptor antibody that recognizes three isoforms of the human leptin receptor present in skeletal muscle (19) was obtained from Linco Research (St. Charles, Missouri, USA). The polyclonal rabbit anti-human SOCS3 antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The monoclonal mouse anti-alpha-tubulin antibody was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit and donkey anti-mouse antibodies were from Jackson ImmunoReseach (West Grove, PA, USA). The Hybond-P transfer membranes, Hyperfilm ECL and the ECL plus Western Blotting Detection System were from Amersham Biosciences (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The ChemiDoc XRS System and the image analysis software Quantity One[®] were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hemel Hempstead Hertfordshire, UK).

Subjects

Seventeen policemen officers were recruited through announcements among the police officers of the Town Hall of Las Palmas de Gran Canaria. After a medical history and clinical examination they were randomly distributed into two groups: (8 controls (C), and 9 to the training group (T) (Table 1). Two subjects from the control group were later excluded due to incomplete data. Written informed consent was obtained from each subject after they received a full explanation about the nature and the possible risks associated with the study procedures. The study was approved by the ethical committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria.

Training program

Subjects trained 3 times a week during, in non-consecutive days, during 12 weeks. Each session started with a first phase of strength training immediately followed by a second phase of endurance training. The strength training consisted of four lower limb exercises (bilateral inclined leg press, unilateral knee extension, bilateral knee flexion, and half-squat), and three upper limb exercises (bench press, seated rowing, and cable triceps extension) in series of 10RM (1st week: 1-2; 2nd week: 2-3; 3rd week: 3-4, and then 4 series until the end of the training program) with 2 min resting periods between series. The exercises included also one series of the abdominal crunch exercise and another series of back extension (using a hyperextension apparatus: Technogym, Gambettola, Italy). Upper body exercises were included to provide a balanced whole body program. The intensity of each session was increased three-weekly as training progressed. At the end of the strength training phase subjects run at ~60% of their estimated VO₂max, starting with 20 min at the beginning of the training program and reaching a maximum running time of 40 min per session from the 10th to the 12th week at an intensity close to 70% of their VO₂max. The running intensity was monitored using Polar® heart rate monitors (Polar, rs400, Kemple, Findland). The maximum strength (1RM) for all exercises used during training was assessed immediately before and at the end of the strength training period, as described elsewhere (17).

Throughout the study period, training and control subjects participated in sports (principally soccer) about twice a week. No injuries occurred throughout the study period.

Assessment of body composition

Body composition was determined by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) (Hologic QDR-1500, Hologic Corp., software version 7.10, Waltham, MA) as described elsewhere (41, 42). The lean mass of the extremities was assumed to be equivalent to the muscle mass (27). From the whole body scans the percentage of body fat (%) was also determined.

Effects of endurance training

To assess the effect of the endurance training VO₂max and the intensity corresponding to the maximal steady state of blood lactate (MLSS) were determined using the shuttle running test (34) and the test proposed by Billat et al. (5). To determine the MLSS, the subjects performed two submaximal running tests on a treadmill (Powerjog EG30, Ergometrix, Barcelona), each lasting 20 min, with a 1% slope, at constant speeds equivalent to ~60 and ~80% of their VO₂max, with a 40 min resting period between them. At the 5th and 20th min the blood lactate concentration was determined in capillary blood obtained from the ear lobe hyperemized with Finalgon®, using a Lactate Pro analyzer (Arkay, JA). The MLSS was calculated as previously described (5).

Muscle biopsies

Pre and post-training muscle biopsies were obtained at 8.00 after an overnight fast and at least 24 h after the last exercise session. A 20 ml blood sample was obtained and the serum separated and stored at -80°C for later analysis. After 10 min rest in the supine position, the skin over the middle portion of the *vastus lateralis* was anaesthetized with 2% lidocaine. Thereafter, a muscle biopsy was obtained using the Bergstrom's technique with suction, as described elsewhere (18). The muscle specimens were cleaned to remove any visible blood fat or connective tissue. Then the muscle tissue was divided into two pieces, one piece was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for western blot analysis. The tissue remaining was immediately mounted with Tissue-Tek and frozen in isopentane pre-cooled with liquid nitrogen, and stored at -80°C.

ATPase histochemistry.

Enough muscle tissue for the pre and post follow up histochemical analysis was obtained in six subjects from the training group, and five subjects from the control group. Serial sections (10 μ m) of the muscle biopsy samples were cut in a cryostat (-20°C), and routine ATPase histochemistry analysis was performed after preincubation at pH of 4.37, 4.60, and 10.30 as previously reported (44).

Total protein extraction, electrophoresis and Western blot analysis

For total protein extraction from human skeletal muscle a piece of frozen tissue was homogenized as described elsewhere (19). After centrifugation at 20,000 g during 15min at 4°C to remove tissue debris, total protein extracts were transferred to clean tubes and an aliquot of each extract was preserved for protein quantification by bicinchoninic acid assay (47). Proteins were solubilized in sample buffer containing 0.0625 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% [w/v] SDS, 10% [v/v] glycerol, 5% [v/v] β -mercaptoethanol and 0.001 % [w/v] bromophenol blue. Equal protein amounts (50 µg) of each sample were electrophorezed on 7.5-10 % sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using

the system of Laemmli (32) and transferred to Hybond-P membranes according to the method of Towbin et al. (51). For immunoblotting, membranes were preincubated with 5% blotting grade blocker non-fat dry milk (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in Tris-buffered saline (TBS) with 0.1% Tween 20 (blotto blocking buffer) for 1 h at room temperature (20-22 °C). To detect the long isoform of the leptin receptor (OB-Rb), membranes were incubated with a rabbit polyclonal specific anti-human OB-Rb antibody. To detect SOCS3 protein expression membranes were incubated with a rabbit polyclonal specific antihuman SOCS3 antibody. To control for differences in loading and transfer efficiency across membranes, an antibody directed against alpha-tubulin was used to hybridize on the same samples. Membrane incubations with polyclonal rabbit anti-OB-Rb (diluted 1:1.500 in blotto blocking buffer), was performed over night at 4°C. Membrane incubations with polyclonal rabbit anti-SOCS3 (diluted 1:500 in blotto blocking buffer) and with monoclonal mouse anti-alpha-tubulin (diluted 1:50,000 in blotto blocking buffer) were performed for 1 h at room temperature. Antibody-specific labeling was revealed by incubation with a HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:20,000) or a HRP-conjugated donkey anti-mouse (1:10,000) antibody both diluted in blotto blocking buffer and visualized with the ECL chemiluminescence kit (Amersham Bisociences, Fairfield, USA). Specific bands were visualized with the ECL chemiluminiscence kit, visualized with the ChemiDoc XRS system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and analyzed

with the image analysis program Quantity one© (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). Data are reported as band intensity of immunostaining values (arbitrary units) obtained for OB-Rb or SOCS3 relative to for α -tubulin. Alpha-tubulin protein content in the muscle biopsies of the two experimental groups before and after the training program was similar (data not shown, all P > 0.05). Western blots were always performed in triplicate with a variation coefficient < 10%. Samples from the same subject were run in the same gel.

Hormonal assays

Serum leptin and free testosterone were determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (ELx800 Universal Microplate Reader, Bioteck Instruments Inc, Vermont, USA), using reagent kits from Linco Research (#EZHL-80SK, Linco ResearchSt. Charles, Missouri, USA) and Diagnostic Systems Laboratories (Webster, Tex., USA), respectively. The sensitivity of the total leptin assays was 0.05 ng/mL. Intra- and inter-assay variances were 2.6% and 3.7% for leptin, 6.5% and 3.1% for free testosterone, respectively.

Statistical analysis

Repeated measures ANOVA was used to determine changes between baseline and the end of the training program, with post hoc comparisons carried out using the Fisher Test. Any variable that did not meet the requirements was logarithmically transformed. The relationships between variables were tested using the Pearson's correlation test. Data are expressed as mean \pm error of the mean and significance was set at the P \leq 0.05 level. Data were analyzed using the SPSS statistical program (SPSS 15.0 Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Muscle strength, body composition and endurance.

Both groups were comparable in age, height and body composition at the start of the study (Table 1). Maximal dynamic strength in lower and upper body exercises was increased with training by between 18 to 54% (Table 2). This was in part due to muscle hypertrophy as reflected by the 1.7% increase in the lean mass in the training group (P<0.05). No significant changes were observed in the lean mass of the lower extremities (18.76 ± 2.63 versus 18.84 ± 2.17 , and 18.82 ± 2.18 versus 19.10 ± 2.08 kg) in the control and training group respectively. In the training group, the whole body fat mass was decreased by 1.8 kg (P<0.05) and the percentage of fat mass by 6 and 7% in legs and trunk, respectively (both P<0.05).

Although not significant changes were observed in the estimated VO_2max , the speed corresponding to the MLSS was increased by 14.4% (Table 2).

Muscle morphology

The effects of the training program on muscle morphology are summarized in Table 3. The muscle morphology was not significantly changed in the control group. With training, the cross-sectional area (CSA) of the type 2 fibers was increased by 15%, with a similar contribution of 2a and type 2x. In contrast, the size changes observed in type 1 fibers were small and did not reach statistical significance. The training program did not alter significantly muscle fiber type composition.

Serum leptin and free testosterone concentrations

Serum leptin concentrations remained unchanged in the control group while it was reduced in the training group (P<0.05). Interestingly, the concentration of leptin per kg of fat mass was reduced by 30% after training (P<0.05). Not significant changes were observed in free testosterone serum concentrations.

Leptin receptor (OB-Rb) protein expression and SOCS3

No significant group by time interaction was found in OB-Rb and SOCS3 protein expression. (Fig. 1). There was no relationship between leptin receptors in skeletal muscle and serum leptin concentration in either group. In training group, no relationship was observed between the changes in the OB-Rb protein expression and the changes in lean leg mass (r=0.53, P=0.14).

Discussion

In the current study, we investigated the effect of strength training followed by endurance training on body composition, serum leptin and free testosterone, as well as leptin receptor (OB-R) and SOCS3 protein expression in the musculus *vastus lateralis.* The training program resulted in a general improvement of muscle strength, which was more marked for the upper body exercises than for the lower extremity exercises. Moreover, the training elicited a moderate hypertrophy of musculus vastus lateralis, particularly of type 2 muscle fibers. In agreement with our hypothesis concurrent strength and endurance elicited a reduction in circulating leptin when corrected for the amount of fat mass. However, in contrast to our hypothesis, this decrease in circulating leptin was not accompanied by down-regulation of leptin receptors in skeletal muscle or changes in basal SOCS3 protein expression. Thus our study indicates that strength training does not change the protein levels of OB-Rb in the musculus vastus lateralis, at least when accompanied by reduced circulating leptin levels and moderate hypertrophy of type 2 muscle fibers.

Previous studies have reported conflicting findings regarding the plasma leptin response to training, but in general most studies report a reduction in plasma or serum leptin concentration when the training program elicited a reduction in fat mass (30). It has been suggested that leptin levels may not only indicate the quantity of adipose tissue but may reflect disturbances in energy balance (22). Leptin serum concentration is dramatically reduced by fasting (8), i.e., in situations with a negative energy balance a reduction in leptin concentration even when adjusted for fat mass is expectable (23), and previously reported in rodents (13). The reduction in leptin concentration per kg of fat mass implies a feedback loop able to influence the balance between leptin production by the adipose tissue and the clearance of leptin, such that leptin concentration is maintained at a lower level than expected for the amount of fat adipose tissue in case of negative energy balance (8).

Our training program elicited a reduction of fat mass, even though the subjects were not asked to vary their usual diet. This response may have been facilitated by an increased lipolytic response and increased fat oxidation during endurance exercise when performed immediately after a strength training session (25). From the reduction in fat mass it can be estimated that our subjects had a negative energy balance of about 200 Kcal/day, this is less than the energy deficit known to be associated with reduced leptin concentration after a endurance (55) or resistance (39) training session. Our study indicates that even this small daily energy deficit is enough to alter the normal relationship between fat mass and serum leptin concentration in a way similar to that observed during fasting (8). The mechanism by which the energy deficit could translate into a lower release of leptin by the adipocytes remains unknown, but may be related to a reduction in the size of the adipocytes (29, 37). Since insulin stimulates leptin release from the

adipocytes (1), another potential mechanism that could have contributed to the observed reduction in circulating leptin is the reduction of plasma insulin that accompanies a negative energy balance.

Leptin, insulin, insulin like growth factor 1 (IGF-1), testosterone and estradiol regulate OB-R expression in a tissue-specific manner (3, 12, 21, 24, 36). However, little attention has been paid to leptin signaling in human skeletal muscle (11, 18, 19). Yasari et al. (53) reported lower gene expression of the long (OB-Rb) and short isoforms (OB-Ra and OB-Re) of the leptin receptor in the liver after 12 weeks of endurance training in rodents, which was accompanied by reductions in fat mass and circulating leptin. Also in rodents, 12 weeks of endurance training down-regulated OB-Rb mRNA in the arcuate nucleus of hypothalamus in rats (28) and subcutaneous adipose tissue (10). Unlike these studies, the present investigation shows that in healthy humans, strength training combined with endurance training does not elicit significant changes in the protein expression of the signalling isoform of the leptin receptor, despite a concomitant reduction of leptin concentration in serum. This implies that the regulation of the expression of leptin receptors in the trained skeletal muscle, particularly when accompanied by muscle hypertrophy is not uniquely determined by circulating leptin, i.e. other factors must regulate gene receptor expression in skeletal muscle. For example, it has been shown that oxidative stress may stimulate OB-R expression in hepatic stellate cells cultures (50), however, it remains unknown if contraction-induced oxidative stress could contribute to up-regulate OB-Rb expression in human skeletal muscle, counteracting a potential negative effect elicited by the reduction of circulating leptin. In agreement with our results Benatti et al. (4) OB-R expression was not reduced in the adipose tissue of rats after 9 weeks of swimming training, despite reduction in body fat and circulating leptin.

In humans OB-Rb protein expression in the musculus vastus lateralis is almost twice as high in women as in men (18). However, OB-Rb protein content is reduced in the *vastus lateralis* and *deltoid* muscle of obese humans compared to non-obese controls (11). In a recent study carried in our laboratory we have observed increased expression of leptin receptors in the hypertrophied dominant musculus triceps brachii of professional tennis players compared to their contralateral arm (40). Thus, muscle loading may facilitate the expression of leptin receptors when accompanied by substantial muscle hypertrophy, at least in muscles with a high proportion of type 2 fibers, as the triceps brachii (45)(40). However, despite that type 2 muscle fibers were hypertrophied in response to the training program no increase in OB-Rb expression was observed in the present study. There are several possible explanations for this finding. First, the magnitude of the muscle hypertrophy associated to increased leptin receptor expression in the musculus triceps brachii is much greater, with muscle fibers that have a mean CSA about 40% greater than observed in the vastus lateralis of our subjects after strength training. Second, the training program elicited a reduction in the amount of circulating leptin per kg of fat mass, which could have counteracted a stimulatory effect of training on the expression of leptin receptors. And third, the performance of the endurance training immediately after the strength training may have blunted some of the signalling normally elicited by strength training (20). For example, our strength training program should have elicited a muscle hypertrophy of both type 1 and 2 muscle fibers (7, 43), however, only the type 2 muscle fibers were significantly hypertrophied; that is our study indicates that performing moderate intensity endurance training immediately after strength training blunts the hypertrophic response in type 1 muscle fibers. A similar finding was reported by Putman et (43), in subjects performing strength training and endurance training in alternate days.

Endurance training performed after strength training may blunt Akt/mTOR signalling through AMPK / TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1 and 2) activation (20). Rodent studies also indicate that endurance training could induce SOCS3 expression (48). Excessive SOCS3 expression could limit muscle hypertrophy in response to strength training (15, 35) by blunting the stimulation elicited by IGF-1 (2, 14) and IL-6 (46). SOCS3 expression also limits cardiomyocyte hypertrophy (54).

Spangenburg et al. (48) reported that 12 week treadmill endurance training increased SOCS-3 mRNA expression by 80% and 154% in the plantaris and soleus muscles of the trained rats when compared to the muscles from the sedentary

animals in muscle biopsies obtained 24h after the last training session. In contrast, our study shows that SOCS3 protein expression was not affected by training, i.e. it seems that in healthy humans there is no need to reduce SOCS3 protein expression to preserve leptin signalling (6) despite a decrease of circulating leptin concentrations. In fact, exercise training has been shown to enhance leptin sensitivity in the trained skeletal muscle of rodents with leptin resistance by a mechanism that does not requires a reduction in SOCS3 mRNA expression (49). The fact that in our study endurance training did not elicit an increase of basal SOCS3 protein content in the trained m. *vastus lateralis* rules out a putative elevation of SOCS3 as a mechanisms responsible for the lack of type 1 muscle hypertrophy in response to our concurrent strength and endurance training.

Although testosterone may fluctuate in response to strength training (31), it may also remain unchanged (16) as observed in the present investigation. Thus, testosterone changes could hardly contribute to explain the effects of our training program on circulating leptin and its receptors in skeletal muscle.

In summary, this article shows that strength training combined with endurance training reduces fat mass and circulating leptin concentration, but the reduction in circulating leptin is proportionally greater than the reduction in fat mass, resulting in a lower leptin/fat mass ratio after training, while this ratio remained unchanged in the control group. Despite the reduction in circulating leptin no changes were observed in skeletal muscle leptin receptors. This investigation also shows that SOCS3 protein expression is not increased in human skeletal muscle by concurrent strength and endurance training. Finally, our study shows that performing endurance training immediately after strength training blunts the hypertrophic response to training of type 1 muscle fibers.

References

- 1. Aas AM, Hanssen KF, Berg JP, Thorsby PM, and Birkeland KI. Insulinstimulated increase in serum leptin levels precedes and correlates with weight gain during insulin therapy in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 2900-2906, 2009.
- 2. Adams GR, and McCue SA. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* 84: 1716-1722, 1998.
- 3. Alonso A, Fernandez R, Moreno M, Ordonez P, Diaz F, and Gonzalez C. Leptin and its receptor are controlled by 17beta-estradiol in peripheral tissues of ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 542-549, 2007.
- 4. Benatti FB, Polacow VO, Ribeiro SM, Gualano B, Coelho DF, Rogeri PS, Costa AS, and Lancha Junior AH. Swimming training down-regulates plasma leptin levels, but not adipose tissue ob mRNA expression. *Braz J Med Biol Res* 41: 866-871, 2008.
- 5. Billat V, Dalmay F, Antonini MT, and Chassain AP. A method for determining the maximal steady state of blood lactate concentration from two levels of submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69: 196-202, 1994.
- 6. Bjørbæk C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, and Myers MG, Jr. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 275: 40649-40657, 2000.
- 7. Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, and Staron RS. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88: 50-60., 2002.
- 8. Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, and Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes* 51: 2105-2112, 2002.
- 9. Dyck DJ. Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity. *Appl Physiol Nutr Metab* 34: 396-402, 2009.
- 10. Friedman JE, Ferrara CM, Aulak KS, Hatzoglou M, McCune SA, Park S, and Sherman WM. Exercise training down-regulates ob gene expression in the genetically obese SHHF/Mcc-fa(cp) rat. *Horm Metab Res* 29: 214-219, 1997.

- 11. Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, Helge JW, Calbet JA, and Guerra B. Leptin receptor 170 KDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. *Exp Physiol* 2009.
- 12. Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, Russo A, Sulkowski S, and Surmacz E. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res* 12: 1447-1453, 2006.
- 13. Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, and Lavoie JM. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 1064-1071, 2004.
- 14. **Goldspink G**. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 194 (Pt 3): 323-334, 1999.
- 15. **Greenhalgh CJ, and Alexander WS**. Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm IGF Res* 14: 200-206, 2004.
- 16. Guadalupe-Grau A, Fuentes T, Guerra B, and Calbet JA. Exercise and bone mass in adults. *Sports Med* 39: 439-468, 2009.
- 17. Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Chavarren J, Dorado C, Santana A, Serrano-Sanchez JA, and Calbet JA. Strength training combined with plyometric jumps in adults: sex differences in fat-bone axis adaptations. *J Appl Physiol* 106: 1100-1111, 2009.
- Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, and Calbet JA. Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. *PLoS ONE* 3: e3466, 2008.
- Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C, and Calbet JA. Leptin receptors in human skeletal muscle. J Appl Physiol 102: 1786-1792, 2007.
- 20. **Hawley JA**. Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? *Appl Physiol Nutr Metab* 34: 355-361, 2009.

- 21. Hikita M, Bujo H, Hirayama S, Takahashi K, Morisaki N, and Saito Y. Differential regulation of leptin receptor expression by insulin and leptin in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 703-709, 2000.
- 22. **Hilton LK, and Loucks AB**. Low energy availability, not exercise stress, suppresses the diurnal rhythm of leptin in healthy young women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E43-49, 2000.
- 23. Hukshorn CJ, Westerterp-Plantenga MS, and Saris WH. Pegylated human recombinant leptin (PEG-OB) causes additional weight loss in severely energy-restricted, overweight men. *Am J Clin Nutr* 77: 771-776, 2003.
- 24. Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, and Fujisawa M. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia* 39: 22-27, 2007.
- 25. Kang J, Rashti SL, Tranchina CP, Ratamess NA, Faigenbaum AD, and Hoffman JR. Effect of preceding resistance exercise on metabolism during subsequent aerobic session. *Eur J Appl Physiol* 107: 43-50, 2009.
- 26. Kile BT, and Alexander WS. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 58: 1627-1635, 2001.
- 27. **Kim J, Wang Z, Heymsfield SB, Baumgartner RN, and Gallagher D**. Total-body skeletal muscle mass: estimation by a new dual-energy X-ray absorptiometry method. *Am J Clin Nutr* 76: 378-383, 2002.
- 28. Kimura M, Tateishi N, Shiota T, Yoshie F, Yamauchi H, Suzuki M, and Shibasaki T. Long-term exercise down-regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. *Neuroreport* 15: 713-716, 2004.
- 29. Kohrt WM, Landt M, and Birge SJ, Jr. Serum leptin levels are reduced in response to exercise training, but not hormone replacement therapy, in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3980-3985, 1996.
- Kraemer RR, Chu H, and Castracane VD. Leptin and exercise. Exp Biol Med (Maywood) 227: 701-708, 2002.
- 31. Kraemer WJ, and Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med* 35: 339-361, 2005.
- 32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 33. Leger B, Derave W, De Bock K, Hespel P, and Russell AP. Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. *Rejuvenation Res* 11: 163-175B, 2008.

- 34. Leger LA, and Lambert J. A maximal multistage 20-m shuttle run test to predict VO2 max. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 49: 1-12, 1982.
- 35. Lieskovska J, Guo D, and Derman E. Growth impairment in IL-6overexpressing transgenic mice is associated with induction of SOCS3 mRNA. *Growth Horm IGF Res* 13: 26-35, 2003.
- 36. Liu ZJ, Bian J, Liu J, and Endoh A. Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. *Horm Metab Res* 39: 489-494, 2007.
- 37. Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, and Friedman JM. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6957-6960, 1995.
- 38. **Muoio DM, Dohm GL, Tapscott EB, and Coleman RA**. Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice. *Am J Physiol* 276: E913-921, 1999.
- 39. Nindl BC, Kraemer WJ, Arciero PJ, Samatallee N, Leone CD, Mayo MF, and Hafeman DL. Leptin concentrations experience a delayed reduction after resistance exercise in men. *Med Sci Sports Exerc* 34: 608-613, 2002.
- 40. Olmedillas H, Sanchis-Moysi J, Fuentes T, Guadalupe-Grau A, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Santana A, Dorado C, Calbet JAL, and Guerra B. Muscle hypertrophy and increased expression of leptin receptors in the musculus triceps brachii of the dominant arm in professional tennis players. *Eur J Appl Physiol* (In Press): 2009.
- 41. Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Royo IA, Vicente-Rodriguez G, Ortiz RA, Chavarren J, and Calbet JA. Effects of weight lifting training combined with plyometric exercises on physical fitness, body composition, and knee extension velocity during kicking in football. *Appl Physiol Nutr Metab* 33: 501-510, 2008.
- 42. Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez JJ, Dorado C, and Calbet JA. Role of muscle mass on sprint performance: gender differences? *Eur J Appl Physiol* 102: 685-694, 2008.
- 43. Putman CT, Xu X, Gillies E, MacLean IM, and Bell GJ. Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. *Eur J Appl Physiol* 92: 376-384, 2004.

- 44. Sanchis-Moysi J, Idoate F, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Alayon S, Carreras A, Dorado C, and Calbet JA. The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, fiber-type distribution and muscle strength. *Scand J Med Sci Sports* 2009.
- 45. Sanchís-Moysi J, Idoate F, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Alayón S, Carreras A, Dorado C, and Calbet JAL. The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, inter-arm asymmetry and muscle fiber type distribution. *Scand J Med Sci Sports* In Press, 2009.
- Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardi M, and Munoz-Canoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 7: 33-44, 2008.
- 47. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.
- 48. **Spangenburg EE, Brown DA, Johnson MS, and Moore RL**. Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *J Physiol* 572: 839-848, 2006.
- 49. Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, and Dyck DJ. Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E57-63, 2004.
- 50. **Tang Y, Zheng S, and Chen A**. Curcumin eliminates leptin's effects on hepatic stellate cell activation via interrupting leptin signaling. *Endocrinology* 2009.
- 51. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354, 1979.
- 52. Trenerry MK, Carey KA, Ward AC, Farnfield MM, and Cameron-Smith D. Exercise-induced activation of STAT3 signaling is increased with age. *Rejuvenation Res* 11: 717-724, 2008.
- 53. Yasari S, Wang D, Prud'homme D, Jankowski M, Gutkowska J, and Lavoie JM. Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and, -e in rats. *Mol Cell Biochem* 324: 13-20, 2009.
- 54. Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, Nakamura T, Pradervand S, Hanada T, Hanakawa Y, Yoshimura A, Ross J, Jr., and Chien KR. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses

gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest* 108: 1459-1467, 2001.

- 55. Zaccaria M, Ermolao A, Roi GS, Englaro P, Tegon G, and Varnier M. Leptin reduction after endurance races differing in duration and energy expenditure. *Eur J Appl Physiol* 87: 108-111, 2002.
- 56. Zhang Y, and Scarpace PJ. The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav* 88: 249-256, 2006.

Acknowledgements

Special thanks are given to José Navarro de Tuero for his excellent technical assistance. This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-13784 and FEDER) and the Gobierno de Canarias (PI2005/177) and FUNCIS (PI/10/07). We are grateful for all the support provided by the Academia Canaria de Seguridad and particularly to Juan Manuel Castañeda Contreras. Special thanks are given to all subjects that volunteered for these experiments. Borja Guerra is a fellow of the "Recursos Humanos y Difusión de la Investigación" Programe (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

Figure legends

Figure 1. Determination of the long isoform of the leptin receptor (OB-Rb or OB-R170) protein expression in *vastus lateralis* muscle biopsies obtained from the control and training group subjects before (dark bars) and after (white bars) the training program. Top panel: representative Western blot assays to determine the OB-Rb and alpha-tubulin protein expression level in the musculus v*astus lateralis*. Lower panel: densitometric immunosignal values (arbitrary units of band densities) of OB-Rb bands relative to those obtained for alpha-tubulin.

Figure 2. Determination of the SOCS3 protein expression in *vastus lateralis* muscle biopsies obtained from the control and training group subjects before (dark bars) and after (white bars) the training program. Top panel: representative Western blot assays to determine the SOCS3 and alpha-tubulin protein expression level in musculus v*astus lateralis*. Lower panel: densitometric immunosignal values (arbitrary units of band densities) of SOC3 bands relative to those obtained for alpha-tubulin.









	Control group					Training group								
		_	Mean		SD				_	Mean		SD	_	
Age (years)			31.5	±	1.4					35.0	±	1.4		
Height (cm)			175.3	±	1.1					175.8	±	1.1		
Body mass (kg)			73.6	±	2.6					74.1	±	2.6		
	E	Befor	е		ŀ	After		Before			After			
	Mean		SD		Mean		SD	Mean		SD		Mean		SD
Total Lean mass (Kg) ^b	57.20	±	2.3		57.2	±	2.2	58.7	±	0.8		59.7	±	1.0*
Arms Lean mass (Kg)	6.56	±	1.40		6.55	±	1.17	6.77	±	0.71		6.98	±	0.59
Legs Lean mass (Kg)	18.76	±	2.63		18.84	±	2.17	18.82	±	2.18		19.10	±	2.08
Trunk Lean Mass (Kg)	28.22	±	2.39		28.11	±	3.11	29.21	±	1.82		29.73	±	2.59
WB (Kg) ^b	13.5	±	3.1		14	±	3	18.8	±	6.6		17.0	±	4.5*
Body fat (%) ^b	18.3	±	4.1		18.8	±	3.7	23.2	±	7.5		21.3	±	5.6*
Free Testosterone (pmol.L ⁻¹)	16.64	±	5.22		17.79	±	4.83	17.06	±	3.96		16.90	±	4.17
Leptin (ng.mL ⁻¹) ^{b, a}	2.72	±	1.33		2.80	±	2.26	5.54	±	5.99		2.66	±	2.74*
Leptin.body fat mass (ng.mL ⁻¹ .Kg ⁻¹) ^b	0.20	±	0.23		0.20	±	0.17	0.25	±	0.27		0.17	±	0.17*

 Table 1. Characteristics of subjects and changes in soft-tissue composition, free testosterone and leptin.

Values are mean ± standard deviation. *P<0.05 pre vs post comparison. WB : Whole Body fat mass. ^a Logarithmically transformed; ^b p <0.05 group x time interaction.

Performance Test		Control arou	מו	-	Training grou	מו	Interaction group x time
	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change	9.000 / 0.000
ILP (kg) SD	181.4 45.6	185.0 48.5	1.9	154.4 19.4	236.1 35.5	52.9*	p<0.05
LE (kg) SD	62.5 12.5	62.5 12.5	0	70.0 15.4	95.5 16.8	36.4*	p<0.05
HS (kg) SD	210.7 72.5	212.1 67.2	0.6	297.7 48.6	451.1 104.0	51.5*	p<0.05
LC (kg) SD	59.6 9.8	58.8 9.9	-1.3	73.8 13.6	92 17.7	24.6*	p<0.05
BP (Kg) SD	66.2 4.8	66.2 7.7	0	71.1 10.5	89.1 17.1	25.3*	p<0.05
SR (kg) SD	73.7 6.9	74.0 5.8	0.4	76.8 10.3	90.5 10.1	17.8*	p<0.05
CTE (kg) SD	35.5 4.2	35.5 4.2	0	41.6 7.4	50.6 7.6	21.6*	p<0.05
VO2max (ml/Kg/min) SD	44.9 8.2	43.4 8.6	-3.3	42.9 8.3	46.0 5.9	7.2	p=0.15
MLSS (km/h) SD				8.6 1.3	9.7 1.7	14.4*	

Table 2. Physical performance before and after training.

Values are mean ± standard deviation. *P<0.05 pre vs post comparison. Inclined leg press (ILP) ; Leg extension (LE) ; Half squat (HS) ; Leg curl (LC); Bench Press (BP) ; Seated Row (SR); Cable Triceps Extension (CTE); Vo2max; Maximum Lactate Steady State (MLSS) . Values are presented as means ± standard deviation.

	Training group					
CSA	Pre	Post	% Change			
Type I (µm ²)	3906.8	4085.3	4.6			
SD	1431.1	1135.3				
Type 2a (µm²)	4312.0	5125.7	18.9*			
SD	979.9	1006.6				
Type 2x (µm ²)	3690.0	4293.8	16.4			
SD	618.5	1070.5				
Type 2 °	4187.6	4962.9	18.5*			
	841.0	992.0				
Fiber type	_					
Type I (%)	49.7	48.6	-2.1			
SD	11.8	10.7				
Type IIa (%)	39.2	40.1	2.3			
SD	11.0	7.3				
Type IIx (%)	11.1	11.3	1.4			
SD	6.83	9.68				

 Table 3. Vastus lateralis cross-sectional area and fiber type before and after training.

Values are mean \pm standard deviation (SD). *P<0.05 pre vs post comparison. Cross sectional area (CSA). °Type 2a and 2x combined.

ESTUDIO IV

Sprint exercise is a leptin signalling mimetic in human skeletal muscle

Borja Guerra¹, Hugo Olmedillas¹, Amelia Guadalupe-Grau¹, Jesús G. Ponce-González¹, David Morales-Alamo¹, Teresa Fuentes¹, Pedro De Pablos-Velasco³ Alfredo Santana^{1,2,4}, Jose A.L. Calbet¹

¹ Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain.

² Genetic Unit, Chilhood Hospital-Materno Infantil de Las Palmas, Avenida Marítima, del Sur s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35016, Spain.

³ Endocrinology Service, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Bco Ballena s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35013, Spain

⁴ Research Unit, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Bco Ballena s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35013, Spain

Correspondence to:

Jose A L Calbet Departamento de Educación Física, Campus Universitario de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Canary Island, Spain. Tel: 0034 928 458 896 Fax: 0034 928 458 867 email: lopezcalbet@gmail.com

Abstract

This study was designed to determine whether sprint exercise activates signalling cascades linked to leptin actions in human skeletal muscle and how this pattern of activation may be interfered by glucose ingestion. Muscle biopsies were obtained in fifteen young healthy men in response to a 30 s sprint exercise (Wingate test) randomly distributed into two groups: the fasting (n=7, C), and the glucose group (n=8, G), who ingested 75g of glucose one hour before the Wingate test. Exercise elicited different patterns of Tyr^{1007/1008}-Jak2, Tyr⁷⁰⁵-STAT3, Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2, Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK phosphorylation and SOCS3 protein expression, during the recovery period after glucose ingestion. Thirty min after the control sprint Tyr⁷⁰⁵-STAT3 and Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 phosphorylation levels were augmented (both, P<0.05). SOCS3 protein expression was increased 120 min after the control sprint but PTP1B protein expression was unaffected. Glucose abolished the 30 min Tyr⁷⁰⁵-STAT3 and Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 phosphorylation and the 120 min SOCS3 protein expression increase. Activation of these signalling cascades occurred despite a reduction of circulating leptin concentration after the sprint. Basal Tyr^{1007/1008}-Jak2 and Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK phosphorylation levels were reduced and increased (both P<0.05), respectively, by glucose ingestion prior to exercise. However, Tyr^{1007/1008}-Jak2 and Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK phosphorylation levels were elevated and reduced, respectively, during recovery when the exercise was preceded by glucose ingestion. These findings indicate that exercise facilitates JAK2 phosphorylation when the level of JAK2 phosphorylation is reduced prior to the start of exercise. Our results also imply that the effect of exercise on p38 MAPK phosphorylation depends on the basal level of p38 MAPK phosphorylation prior to the start of exercise. In conclusion, sprint exercise performed under fasting conditions leptin signalling mimetic skeletal muscle. is a in human

Introduction

Leptin is a hormone secreted primarily by adipocytes from the white adipose tissue and by the stomach (Zhang et al., 1994; Zhang et al., 2005) that plays a crucial role in the regulation of appetite, body fat mass and basal metabolic rate (Zhang et al., 2005) and gonadal function (Roa et al., 2009). Leptin acts on brain and peripheral tissues (Friedman & Halaas, 1998), such as skeletal muscle (Steinberg et al., 2002; Guerra et al., 2007; Guerra et al., 2008), through receptors (OB-Rs) that belong to the to the class I type cytokine receptor family (Tartaglia, 1997; White et al., 1997). Upon binding to the long form of its receptor (OB-Rb), leptin stimulates JAK2, which autophosphorylates and phosphorylates several tyrosine residues (Tyr985 and Tyr1138) of OB-Rb (Bjorbaek & Kahn, 2004). The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) binds to the phosphorylated Tyr¹¹³⁸ in OB-Rb, and this interaction is required for tyrosine phosphorylation and activation of STAT3 by JAK2 (Banks et al., 2000; Bates et al., 2003). Reduced pSTAT3 in presence of increased leptin concentrations is indicative of leptin resistance (Hosoi et al., 2008; Fuentes et al., 2009). In skeletal muscle, leptin also acts through the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) and p38mitogen activated protein kinase (MAPK) signalling pathways (Maroni et al., 2003, 2005). It is known that AMPK may be activated by repeated sprint exercise (Gibala et al., 2009), but less is known about the influence of sprint exercise of a single sprint on AMPK and the other signalling cascades activated by leptin in the skeletal muscles.

Leptin signaling may be down-regulated by the protein suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), which blunts JAK2/STAT3-dependent leptin signalling (Bjorbaek *et al.*, 1998; Bjorbaek *et al.*, 2000) and causes leptin resistance in the skeletal muscle (Steinberg *et al.*, 2006; Eguchi *et al.*, 2007). The protein-tyrosine phosphatase

1B (PTP1B) is also a negative regulator of insulin and leptin sensitivity, acting to dephosphorylate the insulin receptor and the OB-Rb associated kinase JAK2 (Bourdeau *et al.*, 2005; Dube & Tremblay, 2005). Several studies have reported that PTP1B levels and activity are increased in muscle and adipose tissue of obese, insulin resistant, and/or diabetic rodents (Ahmad & Goldstein, 1995b, a; Dadke *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2006) and humans (Ahmad *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 1997a; Ahmad *et al.*, 1997b; Cheung *et al.*, 1999). In fact, diet induced obesity (DIO) increases SOCS3 mRNA expression and PTP1B protein expression and activity in rodent skeletal muscle, causing muscle leptin and insulin resistance (Steinberg *et al.*, 2004; Zabolotny *et al.*, 2008).

Exercise could act as leptin mimetic by reducing the basal levels of PTP1B protein expression/activity in skeletal muscle (Steinberg *et al.*, 2004; Ropelle *et al.*, 2006), but also by activating AMPK, ERK and P38 signalling, as well as STAT3 phosphorylation. However, SOCS3 protein expression is increased 2h after acute intense resistance exercise in human skeletal muscle (Trenerry *et al.*, 2007; Trenerry *et al.*, 2008), which hypothetically could blunt leptin signalling. Moreover, little is known about the effects of sprint exercise on leptin signalling and SOCS3/PTP1B protein expression in human skeletal muscle. Previous work from our group and others have shown increased AMPK phosphorylation 30 min after one bout (Guerra et al., unpublished) or immediately and 3 h after four bouts of sprint exercise in human skeletal muscle (Gibala *et al.*, 2009). Intriguingly, this effect is blunted by the ingestion of 75 g of glucose ingestion 60 min before exercise (Guerra et al., unpublished). It remains unknown if glucose ingestion also inhibits the exercise-induced activation of other leptin signalling pathways. Experiments in cells have shown that hyperinsulinaemia inhibits leptin receptor signalling in humans through JAK2

dephosphorylation (Kellerer *et al.*, 2001). It remains also unknown if glucose ingestion, which elicits high (but physiological) levels of insulin, may influence the protein expression of the negative leptin signalling regulators SOCS3 and PTP1B after one bout of high intensity exercise in human skeletal muscle.

The main aim of the study was to determine if a 30 s sprint exercise (Wingate test) acts as leptin mimetic, by examining the response of the known leptin signalling pathways in skeletal muscle immediately after and during the following 4 hours after the sprint exercise. Another aim was to determine if glucose ingestion one hour before the exercise blunts the activation of the signalling cascades also activated by leptin in skeletal muscle. Finally, we determined the impact of glucose ingestion on basal leptin signalling pathways, SOCS3 and PTP1B protein expression. The main hypothesis to be tested was that an acute bout of brief (30 s) high-intensity exercise will activate signalling cascades in the active skeletal muscle known to be involved in leptin signalling and that this effect will occur independently of circulating leptin levels. We hypothesized also that glucose ingestion one hour prior to the exercise will blunt the activation of these signalling cascades normally elicited by sprint exercise, due to the interring effects of hyperinsulinaemia on leptin signalling.

Materials

The Complete protease inhibitor cocktail was obtained from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The polyclonal rabbit anti-human SOCS3 antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The monoclonal mouse anti-alpha-tubulin antibody was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The monoclonal mouse anti-PTP1B antibody was obtained from Calbiochem

(Darmstadt, Germany). The polyclonal rabbit anti-Tyr⁷⁰⁵-STAT3, the monoclonal mouse anti-STAT3, the polyclonal rabbit anti-Tyr^{1007/1008}-JAK2 and the polyclonal rabbit anti-JAK2 antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit and donkey anti-mouse antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). The Hybond-P transfer membranes, Hyperfilm ECL and the ECL plus Western Blotting Detection System were from Amersham Biosciences (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The ChemiDoc XRS System and the image analysis software Quantity One© were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hemel Hempstead Hertfordshire, UK).

Methods

Subjects

Fifteen healthy male physical education students (age = 23.4 ± 0.6 yr, height = 178 ± 1.8 cm, body mass = 77.5 ± 2.1 kg, body fat = $14.7 \pm 1.9\%$) agreed to participate in this investigation (Table 1). Before volunteering, subjects were given full oral and written information about the course of the study and possible risks associated with participation. Written consent was obtained from each subject. The study was performed in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Ethical Committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria.

General Procedures

The body composition of each subjects was determined by DXA (Hologic QDR-1500, Hologic Corp., software version 7.10, Waltham, MA) as described elsewhere (Ara *et al.*, 2004; Perez-Gomez *et al.*, 2008b). On a different day, subjects reported to the laboratory at 8.00 after an overnight fast and an antecubital vein was catheterized. After
10 min rest in the supine position a 20 ml blood sample was withdrawn and used to measure serum glucose and insulin. Then a muscle biopsy was obtained from the middle portion of the vastus lateralis muscle using the Bergstrom's technique with suction, as described elsewhere (Guerra et al., 2007; Perez-Gomez et al., 2008a). Subjects were randomly divided into a control group (seven subjects) and the glucose group (eight subjects), matched for physical characteristics and performance (Table 1). Three minutes after the resting muscle biopsy and blood sample, the control group performed a 30 seconds Wingate test with a braking force equivalent to 10% of their body mass as described elsewhere (Calbet et al., 1997; Calbet et al., 2003). No warm up was allowed prior to the start of the Wingate test. Right after the Wingate test another muscle biopsy and a blood sample were obtained. The time needed to obtain and freeze the muscle biopsies immediately after the Wingate test was always below 30 s in all cases. To avoid injury-triggered activation of p38 MAPK or ERK1/2 the muscle biopsies were obtained at least 3 cm apart, following the same procedures as those described by Drummond et al. (Drummond et al., 2009). During the following 4 hours the subjects were fasting and sat quietly in laboratory or in the library of our Faculty. During the recovery period additional muscle biopsies and blood samples were obtained at 30, 120 and 240 minutes. The glucose group ingested 75g of glucose (Glucomedics-75 orange, Biomedics, Madrid, Spain) immediately following the resting muscle biopsy and the initial blood sample, thereafter they rested on bed or seated on a chair for 60 min. At the end of this period another muscle biopsy and another blood sample were obtained. Three minutes after the muscle biopsy, subjects performed a Wingate test, also without warming up, and muscle biopsies and blood samples were obtained with the same time frame as for the control group. The muscle specimens were cleaned to

remove any visible blood, fat, or connective tissue. Then the muscle tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later analysis.

Total protein extraction, electrophoresis and Western blot analysis

For total protein extraction from human skeletal muscle a piece of frozen tissue was homogenized as described elsewhere (Guerra et al., 2007). After centrifugation at 20,000 g to remove tissue debris, total protein extracts were transferred to clean tubes and an aliquot of each extract was preserved for protein quantification by bicinchoninic acid assay (Smith et al., 1985). Proteins were solubilized in sample buffer containing 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% [w/v] SDS, 10% [v/v] glycerol, 5% [v/v] βmercaptoethanol and 0.001 % [w/v] bromophenol blue. Equal protein amounts (50 µg) of each sample were electrophorezed on 7.5-10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the system of Laemmli (1970) and transferred to Hybond-P membranes according to the method of Towbin et al. (1979). For immunoblotting, membranes were pre-incubated with 5% blotting grade blocker non-fat dry milk (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead Hertfordshire, UK) in Tris-buffered saline (TBS) with 0.1% Tween 20 (blotto blocking buffer) for 1 h at room temperature (20-22 °C). To detect SOCS3 protein expression membranes were incubated with a rabbit polyclonal specific anti-human SOCS3 antibody. To detect PTP1B protein expression membranes were incubated with a mouse monoclonal specific anti-human PTP1B antibody. To detect Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation membranes were incubated with a rabbit polyclonal antibody that recognizes this kinase only when the residue Tyr⁷⁰⁵ is phosphorylated. To detect total STAT3 membranes were incubated with a mouse monoclonal antibody that recognizes the total form (phosphorylated and non-phosphorylated) of this kinase. To detect Tyr^{1007/1008}-JAK2 phosphorylation membranes were incubated with a rabbit polyclonal antibody that recognizes this kinase only when residues Tyr^{1007/1008} are phosphorylated. To detect total JAK2 membranes were incubated with a rabbit polyclonal antibody that recognizes the total form (phosphorylated and non-phosphorylated) of this kinase. To control for differences in loading and transfer efficiency across membranes, an antibody directed against alpha-tubulin was used to hybridize on the same samples. Membrane incubations with mouse anti-PTP1B (diluted 1:250 in blotto blocking buffer), polyclonal rabbit anti-Tyr⁷⁰⁵-STAT3 (diluted 1:500 in 5% Bovine Serum Albumin in TBS with 0.1% Tween 20 (BSA blocking buffer)), monoclonal mouse anti-STAT3 (diluted 1:750 in BSA blocking buffer), polyclonal rabbit anti-Tyr1007/1008-JAK2 (diluted 1:500 in BSA blocking buffer) and polyclonal rabbit anti-JAK2 (diluted 1:500 in BSA blocking buffer) were performed over night at 4°C. Membrane incubations with polyclonal rabbit anti-SOCS3 (diluted 1:500 in blotto blocking buffer) and with monoclonal mouse anti-alpha-tubulin (diluted 1:10,000 in blotto blocking buffer) were performed for 1 h at room temperature. Antibody-specific labelling was revealed by incubation with a HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:20,000) or a HRPconjugated donkey anti-mouse (1:10,000) antibody both diluted in blotto blocking buffer and visualized with the ECL chemiluminiscence kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Specific bands were visualized with the ECL chemiluminiscence kit, visualized with the ChemiDoc XRS system (Bio-Rad Laboratories) and analyzed with the image analysis program Quantity one[©] (Bio-Rad laboratories). The densitometry analysis was carried out immediately before saturation of the immunosignal. For immunosignal quantification, band densities were normalized to the values obtained from the biopsies taken immediately before the start of the sprint. Data were represented as percentage of immunostaining values obtained for the phosphorylated form of each kinase relative to those obtained for respectively total form (for the quantification of the JAK2 and STAT3 phosphorylation level) or as percentage of immunostaining values obtained for SOCS3 or PTP1B relative to those obtained for alpha tubulin. Alpha-tubulin content in the muscle biopsies of the two experimental groups was similar and did not change over time (data not shown, P > 0.05). Western blot analysis of all proteins studied was performed in triplicate for each muscle biopsy with a variation coefficient less than 10%. Samples from each subject were run in the same gel.

Insulin measurements

Serum insulin was measured by an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) intended for use on Modular Analytics analyzer E170 using Insulin kit reagents (Roche/Hitachi, Indianapolis, USA). In a first incubation, insulin from 20 μ l serum sample, a biotinylated monoclonal insulin-specific antibody and a monoclonal insulin-specific antibody labelled with a ruthenium complex form a sandwich complex. After addition of streptavidin-coated microparticles, the complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin. The reaction mixture is aspirated into the measuring cell where the microparticles are magnetically captured onto the surface of the electrode. Unbound substances are then removed by washing. Application of a voltage to the electrode then induces chemiluminiscent emission which is measured by a photomultiplier. Results are determined via a calibration curve. Insulin sensitivity was 0.20μ U/ml.

Glucose measurements

Serum glucose was measured by the hexokinase method using Gluco-quant reagents (Roche/Hitachi, 11876899216, Indianapolis, USA) with a sensitivity of 2 mg/dL.

Assessment of insulin resistance

In each subject, the degree of insulin resistance was estimated by the Homeostasis model assessment (HOMA). In brief, fasting plasma insulin and fasting plasma glucose values were used to calculate an index of insulin resistance. The HOMA index was calculated as fasting insulin concentration (μ U·mL⁻¹) x fasting glucose concentration (mmol·L⁻¹)/22.5.

Leptin Assays

Serum leptin was determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (ELx800 Universal Microplate Reader, Bioteck Instruments Inc, Vermont, USA), using reagent kits from Linco Research (#EZHL-80SK, Linco ResearchSt. Charles, Missouri, USA) and following the manufacturer's instructions. The sensitivity of the total leptin assays was 0.05 ng/mL. The intra-assay coefficient variation was 3.8% and the inter-assay coefficient of variation was 4.4%.

Statistics

Variables were checked for normal distribution by using a Kolmogorov-Smirnov test with the Lilliefors correction, and for equality of variances with the Levene's test. When necessary, the analysis was done on logarithmically transformed data. For betweengroups comparisons, the individual responses were normalized to the level of phosphorylation observed just before the start of the Wingate test. A mixed-model ANOVA with repeated measures over time and one factor (treatment, not repeated) with two levels (control vs. glucose) was used to compare the responses with the value just before the start of the Wingate test, using values normalized to the level of phosphorylation observed just before the start of the Wingate test. When there was a significant treatment by time interaction, intra-group effects were tested using one-way ANOVA separately in each group, and pairwise comparisons were carried out using the Holm–Bonferroni method. Unpaired t-tests were used for planned comparisons to test between-group differences at specific time points, the corresponding P values were adjusted for multiple comparisons with the Holm–Bonferroni method. Since we missed three muscle biopsies corresponding to the 240 min time point (two in the glucose group and one in the control group), these analyses were limited to the first 120 min. The 240 min point was compared to the pre-exercise condition using a paired t-test. Likewise, pre-glucose values were compared to pre-exercise values using a paired t-test, since we had only one comparison of this type. The relationship between variables was determined using linear regression analysis. Values are reported as the mean \pm standard error of the mean (unless otherwise stated). P \leq 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using SPSS v.15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Influence of glucose ingestion on glucose, insulin, and leptin serum concentrations at rest and after exercise.

Insulin serum concentration was elevated 1 hour after the ingestion of glucose by 3.7 fold, (*P*<0.05, Table 2). Thus, at the start of the Wingate test, insulin levels were higher (Table 2) in the glucose group (GG) compared to the control group (CG). However, resting glucose concentration remained unchanged 1 h after the ingestion of glucose (Table 2).

During the recovery period, glucose concentration was lower after glucose ingestion, while it increased in the CG revealing a significant group-by-time interaction (P<0.05, Table 2). Glucose ingestion prior to exercise resulted in a continuous reduction of insulin concentration during recovery in GG, while in the CG insulin was increased at 30 min (from 6.4 ± 3.3 at rest (R) to 14.3 ± 2.7 µU/mL 30 min after exercise; P<0.05, Time by group interaction P<0.05; Table 2) and then followed a decreasing pattern similar to that observed in the GG.

Leptin concentration was reduced in response to exercise by 17% and 26%, (120 and 240 min after sprint exercise, P<0.05, Table 2) in the CG. Glucose ingestion prior to exercise accentuated this response and leptin was reduced by 60, 69, and 65% at 30, 120, 240 min into the recovery period, respectively P<0.05; ANOVA interaction versus CG P=0.06, Table 2).

Influence of glucose ingestion on HOMA.

HOMA values increased by almost 4.9 fold 1h after the ingestion of glucose (from 1.4 ± 1.2 at -60 min to 6.4 ± 7.6 at R, *P*<0.05, Table 2). Thus, at the start of the Wingate test,

HOMA levels were 80% higher in GG compared to CG, reflecting a significant group by time ANOVA interaction (P<0.05, Table 2). This difference disappeared just after exercise. During the recovery period, HOMA increased significantly 30 min after the sprint bout in CG (from 1.5 ± 0.8 at R to 3.7 ± 0.7 at 30 min after exercise, P<0.05, Table 2). However, glucose ingestion prior to exercise resulted in a continuous reduction of HOMA values. Afterwards, both groups followed the same recovery pattern, returning to basal values.

Influence of glucose ingestion on Tyr^{1007/1008}-Jak2 phosphorylation at rest and after exercise.

Basal Tyr^{1007/1008}-Jak2 phosphorylation was reduced one hour after the ingestion of glucose (from 186 \pm 9% to 100 \pm 24.4%, P < 0.05) (Figure 1A). Under fasting conditions, Tyr^{1007/1008}-Jak2 phosphorylation did not change significantly in response to exercise (all *P*>0.05 versus pre-exercise) (Figure 1A). In contrast, Tyr^{1007/1008}-Jak2 phosphorylation was increased 120 min after the Wingate test performed following the ingestion of glucose (100 \pm 24.4 and 188.7 \pm 42.8%, pre-exercise and 120 min post-exercise, respectively, *P*<0.05) (Figure 1A).

 $Tyr^{1007/1008}$ -Jak2 phosphorylation and HOMA values were inversely related only in the glucose group (r=-0.84, P<0.05).

Influence of glucose ingestion on Ty^{r705} -STAT3 phosphorylation at rest and after exercise.

Basal Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation was not affected by the ingestion of glucose $(123.9 \pm 4.6\% \text{ to } 100 \pm 5.2\%, P=0.1)$ (Figure 1B). Compared to pre-exercise conditions,

Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation was increased 30 min after the sprint exercise (from 100 \pm 5.2% to 249 \pm 72%, *P*<0.05) (Figure 1B). Glucose ingestion blunted Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation in response to the Wingate test. The magnitude of Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation 30 min after the Wingate was higher during the test performed under fasting conditions than after glucose ingestion (*P*<0.05) (Figure 1B).

Influence of glucose ingestion on ERK1/2 phosphorylation at rest and after exercise.

Basal Thr²⁰²/Ty²⁰⁴-ERK1/2 phosphorylation was reduced one hour after the ingestion of glucose (from 342 ± 28.3% to 100 ± 17.3%; P<0.05 versus -60 min) (Figure 2A). Compared to pre-exercise conditions, Thr²⁰²/Ty²⁰⁴-ERK1/2 phosphorylation was increased 30 min after the sprint exercise (from 100 ± 6.9% to 467 ± 168%; P<0.05 versus resting, Figure 2A). Glucose ingestion reduced Thr²⁰²/Ty²⁰⁴-ERK1/2 phosphorylation 30 min after the Wingate test (Figure 2A). There was an interaction between Thr²⁰²/Ty²⁰⁴-ERK1/2 phosphorylation after exercise and glucose ingestion (P<0.05). Two and 4 hours after the Wingate test Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 phosphorylation was still elevated in the glucose but not in the control group (P<0.05) (Figure 2A).

Influence of glucose ingestion on p38 Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² phosphorylation at rest and after exercise.

Basal Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK phosphorylation was increased 2.5-fold one hour after the ingestion of glucose (from $40.4\pm0.4\%$ to $100\pm16.3\%$; *P*<0.05) (Figure 2B). However, Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK phosphorylation did not change significantly during the 4 hours following the control Wingate test (Figure 2B). In contrast, compared to pre-exercise levels, Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK was reduced immediately and 30 min after the Wingate test performed following glucose ingestion (from $100\pm16.3\%$ to $48.1\pm17\%$ and 40.5 ± 9.6 , respectively *P*<0.05) (Figure 2B).

Influence of glucose ingestion on SOCS3 protein expression at rest and after exercise.

Basal SOCS3 protein expression was unaffected one hour after the ingestion of glucose (from $80.7 \pm 4.9\%$ to $100 \pm 26.9\%$, *P*=0.45) (Figure 3A). Compared to pre-exercise conditions, SOCS3 protein expression was increased 120 min after the control sprint exercise (from $100 \pm 8.41\%$ to $248.5 \pm 42.5\%$; *P*<0.05) (Figure 3A), however, this effect was blunted by the ingestion of glucose (Figure 3A).

SOCS3 protein expression was not related to serum leptin concentration, HOMA or Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK in either group.

Influence of glucose ingestion in PTP1B protein expression at rest and after exercise.

Basal PTP1B protein expression was not significantly changed by either ingestion of glucose or exercise (Figure 3B). In the glucose group, PTP1B protein expression was positively correlated with the HOMA values (r=0.86, P<0.05) and negatively with Thr²⁰²/Ty²⁰⁴-ERK1/2 phosphorylation (r=-0.87, P<0.05) and Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation (r=-0.97, P<0.01). However, the relationship between PTP1B protein expression and HOMA (r=0.79, P=0.10) did not reach statistical significance in the control group.

Discussion

The present study examined changes in leptin signalling pathways in human skeletal muscle after sprint exercise. Because leptin and insulin share some signalling pathways in skeletal muscle (Hekerman et al., 2005) and since hyperinsulinemia inhibits leptin receptor signalling in human embryonic fibroblast 293 cells (HEK 293 cells) (Kellerer et al., 2001), we have also determined the influence that glucose ingestion has on leptin signalling in response to sprint exercise. In a previous work, we showed that glucose ingestion one hour before sprint exercise attenuates the exercise-induced Akt and and prevents the exercise-induced Thr¹⁷²-AMPK α AS160 phosphorylation, phosphorylation (Guerra et al., unpublished). In the present study we have shown that a 30s all out cycling sprint performed under fasting conditions stimulated the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and the extracellular regulated kinases (ERK) signalling cascades, both activated by leptin (Bjorbaek & Kahn, 2004; Myers et al., 2008), and elicited an increase of SOCS3, also induced by leptin (Bjorbaek et al., 2000). In agreement with our hypothesis, glucose ingestion, likely through the sustained elevation of insulin, attenuated the exercise-induced JAK2 phosphorylation, blunting the STAT3 and ERK phosphorylation, and the elevation of SOCS3 protein expression as well. Altogether, these results indicate that sprint exercise performed under fasting conditions is a leptin signalling mimetic in human skeletal muscle and that glucose ingestion prior to the sprint exercise blunts this effect.

JAK2/STAT3 response to sprint exercise and oral glucose ingestion

The JAK2/STAT3 signalling pathway is the main signalling cascade activated by leptin to regulate energy balance and body weight in central nervous system and peripheral tissues, such as skeletal muscle (Myers, 2004; Myers *et al.*, 2008). In human skeletal muscle, JAK2 phosphorylation has been reported immediately after moderate-intensity exercise (30 min of cycling at 70% of VO₂max) performed after an overnight fast (Consitt *et al.*, 2008). In contrast, we did not observed significant changes in JAK2 phosphorylation immediately after or during the recovery period following a 30 s all-out exercise. Thus, it seems that exercise duration and/or the total energy expended predominates over exercise intensity in eliciting JAK2 phosphorylation.

Administration of insulin at physiological dose elicits Jak2 phosphorylation in rat skeletal muscle (Saad *et al.*, 1996). We observed reduced Jak2 phosphorylation 1h after the oral ingestion of glucose (resting state). These results are in agreement with previous data indicating that hyperinsulinaemia contributes to the pathogenesis of leptin resistance through a downregulation of JAK2 phosphorylation in human embryonic kidney fibroblast 293 cells (HEK 293 cells) (Kellerer *et al.*, 2001). Hyperinsulinaemia inhibits leptin receptor signalling by a downregulation of JAK2 phosphorylation in HEK 293 cells via tyrosin phosphatase SHP-1-dependent pathways (Kellerer *et al.*, 2001). In turn, reduced JAK2 phosphorylation may blunt OB-Rb phosphorylation (Tyr¹¹³⁸) and, hence, leptin signalling. Interestingly, exercise after glucose ingestion restored resting JAK2 phosphorylation levels, indicating that exercise acts as a leptin mimetic, even when JAK2 phosphorylation is reduced by increased insulin levels. Altogether, these results suggest that JAK2 is not activated by a single bout of sprint exercise in human skeletal muscle, but that exercise facilitates JAK2 phosphorylation when the level of JAK2 phosphorylation is reduced prior to the start of exercise.

Boonsong et al. (2007) reported unchanged STAT3 phosphorylation in human skeletal muscle after a 4h hyperinsulinaemic euglycaemic clamp performed 24 h after completing 90 min of one-legged cycling at moderate intensity (60% of VO₂max). In

agreement, glucose administration did not modify basal STAT3 phosphorylation in our study. Moreover, glucose ingestion blunted the 30 min post-exercise Tyr^{705} -STAT3 phosphorylation observed in the control group. This phenomenon may have been caused by the concomitant downregulation of JAK2 phosphorylation observed 60 min after the oral glucose ingestion and immediately following sprint exercise. Upon its tyrosine phosphorylation, JAK2 is able to phosphorylate several tyrosine residues (Tyr985 and Tyr1138) of the long isoform of the leptin receptor OB-Rb (Bjorbaek & Kahn, 2004). Then STAT3 binds to the phosphorylated Tyr¹¹³⁸ in OB-Rb, and this interaction is required for tyrosine phosphorylation and activation of STAT3 by JAK2 (Banks *et al.*, 2000; Bates *et al.*, 2003).

In agreement with our results, it has been reported that Tyr^{705} -STAT3 phosphorylation increases 2 h after a single bout of intense resistance exercise (Trenerry *et al.*, 2007; Trenerry *et al.*, 2008). However, STAT3 phosphorylation remained unchanged after 90 min of one legged cycling at 60% of VO₂max (Boonsong *et al.*, 2007). Thus, exercise-induced Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation is more dependent on the intensity than the duration of the exercise. Tyr⁷⁰⁵-STAT3 phosphorylation is essential for the formation of homo- or heterotrimers, nuclear translocation, and subsequent STAT3-dependent increases in the transcriptional activity of responsive genes (Decker & Kovarik, 1999), including genes modulated by leptin (Bates *et al.*, 2003). In addition, of leptin signalling, STAT3 is the signal transducer of numerous stimuli (Stepkowski *et al.*, 2008), and is involved in the regulation, among other processes, of cellular proliferation, differentiation, remodelling, repair, adaptation and regeneration of skeletal muscle, programmed cell death, inflammation, muscle hypertrophy, and the immune response (Akira, 2000; Judd *et al.*, 2006; Trenerry *et al.*, 2007; Trenerry *et al.*, 2008).

ERK1/2 and p38-mitogen activated protein kinase (MAPK) in response to sprint exercise and oral glucose ingestion

Leptin also elicits phosphorylation of the Tyr985 in the OB-Rb, which mediates the recruitment of SHP-2, which is then phosphorylated and, in turn, recruits growth factor receptor binding (Grb)-2 (Grb-2) to mediate activation of the p21ras to stimulate the upstream activators of ERK (Lowenstein et al., 1992; Banks et al., 2000). ERK may be also phosphorylated directly by a Jak2, i.e., by an OR-Rb-independent mechanism (Banks et al., 2000). In the present investigation, serum leptin concentration and Jak2 phosphorylation were reduced and hence ERK1/2 phosphorylation was also decreased after the ingestion of glucose. Both resistance (Creer et al., 2005; Deldicque et al., 2008) and endurance exercise can induce ERK1/2 phosphorylation (Goodyear et al., 1996; Aronson et al., 1997; Yu et al., 2001). The effects of endurance exercise (70% of VO2max) increases with the exercise duration up to 30 min, then it stabilizes, and upon cessation of exercise ERK return to basal level in approximately 60 min (Widegren et al., 1998). Even low-intensity (35-40% of VO₂max) exercise may induce ERK 1/2 phosphorylation, however this response is markedly accentuated at 75-85% of VO₂max (Widegren et al., 2000; Richter et al., 2004). Although the high tensions achieved during sprint exercise (Martineau & Gardiner, 2001) and the elevated exercise intensity achieved during the Wingate test should have facilitated ERK1/2 phosphorylation, in the present study, no significant effects on ERK1/2 phosphorylation were observed immediately after the Wingate test. However, this response was delayed and observed into the recovery period, suggesting ERK1/2 phosphorylation in skeletal muscle is more depend on metabolic factors than on tension. This interpretation is supported by the delaying effects that glucose ingestion had on ERK1/2 phosphorylation in response to sprint exercise.

Leptin may induce p38-mitogen activated protein kinase (MAPK) phosphorylation by a nitric oxide dependent mechanism (Sharma et al., 2009). In agreement, in the present study glucose ingestion was accompanied by increased serum leptin and increased p38 phosphorylation in resting skeletal muscle. Although this effect might have facilitated also by the increased insulin levels (Thong et al., 2003). p38 MAPK phosphorylation may be elicited by both resistance (Karlsson *et al.*, 2004; Deldicque et al., 2008) and endurance exercise (Yu et al., 2003). A recent study by Gibala et al. (2009) reported no significant changes in p38 MAPK phosphorylation immediately after a 30 s sprint exercise. However, Gibala's subjects were studied 2-3 hours after a light meal of their own choosing and it is difficult to compare these results to ours, where p38 MAPK phosphorylation did not increase when the Wingate test was performed under fasting conditions. Our study shows that when the sprint exercise is performed one hour after the ingestion of glucose, when p38 MAPK phosphorylation is increased prior to the start of exercise, then p38 MAPK phosphorylation is reduced by the exercise. This response does not seem to be caused by changes in leptin, since leptin concentration was not acutely affected by sprint exercise. Thus, the effect of exercise on p38 MAPK phosphorylation depends on the basal level of p38 MAPK phosphorylation prior to the start of exercise.

Although no response was observed alter a single 30 s sprint by Gibala et al (2009), after four 30-s sprints interspaced with four minutes of rest p38 MAPK phosphorylation was moderately increased (1.4-fold) (Gibala *et al.*, 2009). Thus, it seems that p38 MAPK phosphorylation is also more dependent on the metabolic effects of exercise, which accumulate by repeated sprint exercise, and exercise duration than on exercise intensity or muscle tension.

SOCS3 and PTP1B in response to sprint exercise and oral glucose ingestion

Although glucose administration was accompanied by a small increase of serum leptin, this effect was not enough to elicit an increase in STAT3 phosphorylation and, hence, SOCS3 remained also unaffected. Little is known about the potential effect of exercise on SOCS3. It has been also reported that endurance exercise induces SOCS3 mRNA in rodent skeletal muscle (Spangenburg et al., 2006) and resistance exercise increases SOCS3 protein expression 2 hour after cessation of exercise in young men (Trenerry et al., 2008). In the present study, SOCS3 protein expression was increased two hour after the sprint exercise only when the exercise was performed under fasting conditions. The increased in SOCS3 protein expression does not appears to have been elicited by a leptin/STAT3 depending mechanism, since STAT3 phosphorylation was elevated at 120 and 240 min after the sprint exercise performed after glucose ingestion, when SOCS3 protein expression remained at basal levels. Thus, the exercise-induce elevation of SOCS3 may have elicited by other mechanism such as elevation of IL-6 (Kiu et al., 2009), which is known to be blunted by glucose ingestion (Febbraio et al., 2003). It has been reported that activation of p38 MAPK is involved in SOCS3-induction by proinflammatory mediators such as TNFa (Bode et al., 1999) or by other cytokines such as IL-6 (Bode et al., 2001) and IL-4 (Canfield et al., 2005), by facilitating the stabilization of SOCS3 mRNA (Ehlting et al., 2007). However, in the present study, p38 MAPK does not seem to be involved in the increased SOCS3 expression 120 min after the control Wingate test.

Interestingly, the elevation of SOCS3 was not accompanied by increased HOMA, indicating that in vivo SOCS3 does not seem to play a determinant role in the regulation of insulin sensitivity, as previously suggested by Spangenburg et al. (2006).

Although in the present study no significant changes were observed in PTP1B protein expression, a previous study has shown that in rodent skeletal muscle with increased PTP1B levels due to diet-induced obesity, a single bout of prolonged endurance exercise reduced both PTP1B protein expression and activity (Ropelle *et al.*, 2006). Further studies are needed to determine if in humans with elevated PTP1B protein/activity a single bout of sprint exercise may be sufficient to restore the normal situation.

In conclusion, this study indicates that sprint exercise performed under fasting conditions is a leptin signalling mimetic in human skeletal muscle, since exercise is able to activate the same signalling cascades activated by leptin, independently of serum leptin concentrations. However, glucose ingestion one hour prior to the sprint exercise abolishes part of the exercise-elicited responses, likely due to the increase in insulin concentration, which is known to counteract leptin signalling in cell cultures. We have also shown that glucose ingestion reduces basal Tyr^{1007/1008}-Jak2 and increases basal Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK phosphorylation levels in human skeletal muscle. Moreover, Tyr^{1007/1008}-Jak2 and Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²-p38 MAPK phosphorylation levels were elevated and reduced, respectively, during recovery when the exercise was preceded by glucose ingestion. These findings indicate that exercise facilitates JAK2 phosphorylation when the level of JAK2 phosphorylation is reduced prior to the start of exercise. Our results also imply that the effect of exercise on p38 MAPK phosphorylation depends on the basal level of p38 MAPK phosphorylation prior to the start of exercise.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFI2003-09638, BFU2006-13784 and FEDER) and the Gobierno de Canarias (PI2005/177) and FUNCIS (PI/10/07). Borja Guerra is a fellow of the "Recursos Humanos y Difusión de la Investigación" Programme (ISCIII, MSC, Spain). Special thanks are given to José Navarro de Tuero for his excellent technical assistance.

References

- Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL & Goldstein BJ. (1997a). Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *The Journal of clinical investigation* 100, 449-458.
- Ahmad F, Considine RV, Bauer TL, Ohannesian JP, Marco CC & Goldstein BJ. (1997b). Improved sensitivity to insulin in obese subjects following weight loss is accompanied by reduced proteintyrosine phosphatases in adipose tissue. *Metabolism* 46, 1140-1145.
- Ahmad F, Considine RV & Goldstein BJ. (1995). Increased abundance of the receptor-type proteintyrosine phosphatase LAR accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects. *The Journal of clinical investigation* **95**, 2806-2812.
- Ahmad F & Goldstein BJ. (1995a). Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. *The American journal of physiology* **268**, E932-940.
- Ahmad F & Goldstein BJ. (1995b). Increased abundance of specific skeletal muscle protein-tyrosine phosphatases in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes mellitus. *Metabolism* 44, 1175-1184.
- Akira S. (2000). Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. Oncogene 19, 2607-2611.
- Ara I, Vicente-Rodriguez G, Jimenez-Ramirez J, Dorado C, Serrano-Sanchez JA & Calbet JA. (2004). Regular participation in sports is associated with enhanced physical fitness and lower fat mass in prepubertal boys. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 1585-1593.
- Aronson D, Violan MA, Dufresne SD, Zangen D, Fielding RA & Goodyear LJ. (1997). Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *The Journal* of clinical investigation 99, 1251-1257.
- Banks AS, Davis SM, Bates SH & Myers MG, Jr. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. J Biol Chem 275, 14563-14572.
- Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW & Myers MG, Jr. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421, 856-859.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL & Flier JS. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* **139**, 3485-3491.
- Bjorbaek C & Kahn BB. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* **59**, 305-331.
- Bjorbaek C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS & Myers MG, Jr. (2000). SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* **275**, 40649-40657.
- Bode JG, Ludwig S, Freitas CA, Schaper F, Ruhl M, Melmed S, Heinrich PC & Haussinger D. (2001). The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biological chemistry* **382**, 1447-1453.
- Bode JG, Nimmesgern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W, Haussinger D, Heinrich PC & Graeve L. (1999). LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS letters* **463**, 365-370.
- Boonsong T, Norton L, Chokkalingam K, Jewell K, Macdonald I, Bennett A & Tsintzas K. (2007). Effect of exercise and insulin on SREBP-1c expression in human skeletal muscle: potential roles for the ERK1/2 and Akt signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 35, 1310-1311.

- Bourdeau A, Dube N & Tremblay ML. (2005). Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 203-209.
- Calbet JA, Chavarren J & Dorado C. (1997). Fractional use of anaerobic capacity during a 30- and a 45-s Wingate test. *European Journal of Applied Physiology* **76**, 308-313.
- Calbet JA, De Paz JA, Garatachea N, Cabeza de Vaca S & Chavarren J. (2003). Anaerobic energy provision does not limit Wingate exercise performance in endurance-trained cyclists. *J Appl Physiol* **94**, 668-676.
- Canfield S, Lee Y, Schroder A & Rothman P. (2005). Cutting edge: IL-4 induces suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells by a mechanism dependent on activation of p38 MAPK. *J Immunol* **174**, 2494-2498.
- Consitt LA, Wideman L, Hickey MS & Morrison RF. (2008). Phosphorylation of the JAK2-STAT5 pathway in response to acute aerobic exercise. *Med Sci Sports Exerc* **40**, 1031-1038.
- Creer A, Gallagher P, Slivka D, Jemiolo B, Fink W & Trappe S. (2005). Influence of muscle glycogen availability on ERK1/2 and Akt signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. J Appl Physiol 99, 950-956.
- Cheung A, Kusari J, Jansen D, Bandyopadhyay D, Kusari A & Bryer-Ash M. (1999). Marked impairment of protein tyrosine phosphatase 1B activity in adipose tissue of obese subjects with and without type 2 diabetes mellitus. *J Lab Clin Med* **134**, 115-123.
- Dadke SS, Li HC, Kusari AB, Begum N & Kusari J. (2000). Elevated expression and activity of proteintyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 583-589.
- Decker T & Kovarik P. (1999). Transcription factor activity of STAT proteins: structural requirements and regulation by phosphorylation and interacting proteins. *Cell Mol Life Sci* 55, 1535-1546.
- Deldicque L, Atherton P, Patel R, Theisen D, Nielens H, Rennie MJ & Francaux M. (2008). Decrease in Akt/PKB signalling in human skeletal muscle by resistance exercise. *Eur J Appl Physiol* **104**, 57-65.
- Drummond MJ, Fry CS, Glynn EL, Dreyer HC, Dhanani S, Timmerman KL, Volpi E & Rasmussen BB. (2009). Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. *The Journal of physiology* 587, 1535-1546.
- Dube N & Tremblay ML. (2005). Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 108-117.
- Eguchi M, Gillis LC, Liu Y, Lyakhovsky N, Du M, McDermott JC & Sweeney G. (2007). Regulation of SOCS-3 expression by leptin and its co-localization with insulin receptor in rat skeletal muscle cells. *Mol Cell Endocrinol* **267**, 38-45.
- Ehlting C, Lai WS, Schaper F, Brenndorfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, Ludwig S, Blackshear PJ, Gaestel M, Haussinger D & Bode JG. (2007). Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. J Immunol 178, 2813-2826.
- Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krustrup P, Ott P, Secher NH & Pedersen BK. (2003). Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *The Journal of physiology* 549, 607-612.
- Friedman JM & Halaas JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770.

- Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, Helge JW, Calbet JA & Guerra B. (2009). Leptin receptor 170 KDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. *Exp Physiol*.
- Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ & Hargreaves M. (2009). Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1{alpha} in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **106**, 929-934.
- Goodyear LJ, Chang PY, Sherwood DJ, Dufresne SD & Moller DE. (1996). Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *The American journal of physiology* **271**, E403-408.
- Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C & Calbet JA. (2008). Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. *PLoS ONE* 3, e3466.
- Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C & Calbet JA. (2007). Leptin receptors in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **102**, 1786-1792.
- Hekerman P, Zeidler J, Bamberg-Lemper S, Knobelspies H, Lavens D, Tavernier J, Joost HG & Becker W. (2005). Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. *Febs J* 272, 109-119.
- Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M & Ozawa K. (2008). Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol Pharmacol* **74**, 1610-1619.
- Judd LM, Bredin K, Kalantzis A, Jenkins BJ, Ernst M & Giraud AS. (2006). STAT3 activation regulates growth, inflammation, and vascularization in a mouse model of gastric tumorigenesis. *Gastroenterology* 131, 1073-1085.
- Karlsson HK, Nilsson PA, Nilsson J, Chibalin AV, Zierath JR & Blomstrand E. (2004). Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E1-7.
- Kellerer M, Lammers R, Fritsche A, Strack V, Machicao F, Borboni P, Ullrich A & Haring HU. (2001). Insulin inhibits leptin receptor signalling in HEK293 cells at the level of janus kinase-2: a potential mechanism for hyperinsulinaemia-associated leptin resistance. *Diabetologia* 44, 1125-1132.
- Kiu H, Greenhalgh CJ, Thaus A, Hilton DJ, Nicola NA, Alexander WS & Roberts AW. (2009). Regulation of multiple cytokine signalling pathways by SOCS3 is independent of SOCS2. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 1.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam NT, Covey SD, Lewis JT, Oosman S, Webber T, Hsu EC, Cheung AT & Kieffer TJ. (2006). Leptin resistance following over-expression of protein tyrosine phosphatase 1B in liver. J Mol Endocrinol 36, 163-174.
- Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D & Schlessinger J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431-442.
- Maroni P, Bendinelli P & Piccoletti R. (2003). Early intracellular events induced by in vivo leptin treatment in mouse skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* **201**, 109-121.
- Maroni P, Bendinelli P & Piccoletti R. (2005). Intracellular signal transduction pathways induced by leptin in C2C12 cells. *Cell Biol Int* **29**, 542-550.

- Martineau LC & Gardiner PF. (2001). Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. *J Appl Physiol* **91**, 693-702.
- Myers MG, Cowley MA & Munzberg H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* **70**, 537-556.
- Myers MG, Jr. (2004). Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res* **59**, 287-304.
- Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Royo IA, Vicente-Rodriguez G, Ortiz RA, Chavarren J & Calbet JA. (2008a). Effects of weight lifting training combined with plyometric exercises on physical fitness, body composition, and knee extension velocity during kicking in football. *Appl Physiol Nutr Metab* 33, 501-510.
- Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez JJ, Dorado C & Calbet JA. (2008b). Role of muscle mass on sprint performance: gender differences? *Eur J Appl Physiol* **102**, 685-694.
- Richter EA, Vistisen B, Maarbjerg SJ, Sajan M, Farese RV & Kiens B. (2004). Differential effect of bicycling exercise intensity on activity and phosphorylation of atypical protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase in skeletal muscle. *The Journal of physiology* 560, 909-918.
- Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, Sanchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Romero M, Aguilar E, Lopez M, Gaytan F, Dieguez C, Pinilla L & Tena-Sempere M. (2009). The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology* 150, 5016-5026.
- Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Picardi PK, Faria MC, Cintra DE, Fernandes MF, Flores MB, Velloso LA, Saad MJ & Carvalheira JB. (2006). Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *The Journal of physiology* 577, 997-1007.
- Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC & Velloso LA. (1996). Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* **271**, 22100-22104.
- Sharma V, Mustafa S, Patel N, Wambolt R, Allard MF & McNeill JH. (2009). Stimulation of cardiac fatty acid oxidation by leptin is mediated by a nitric oxide-p38 MAPK-dependent mechanism. *European journal of pharmacology* 617, 113-117.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150, 76-85.
- Spangenburg EE, Brown DA, Johnson MS & Moore RL. (2006). Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *The Journal of physiology* 572, 839-848.
- Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Gorgun CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW & Kemp BE. (2006). Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMPkinase signaling. *Cell Metab* 4, 465-474.
- Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ & Dyck DJ. (2002). Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E187-192.

29

- Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C & Dyck DJ. (2004). Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E57-63.
- Stepkowski SM, Chen W, Ross JA, Nagy ZS & Kirken RA. (2008). STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions. *Transplantation* 85, 1372-1377.
- Tartaglia LA. (1997). The leptin receptor. J Biol Chem 272, 6093-6096.
- Thong FS, Derave W, Urso B, Kiens B & Richter EA. (2003). Prior exercise increases basal and insulininduced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **94**, 2337-2341.
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Trenerry MK, Carey KA, Ward AC & Cameron-Smith D. (2007). STAT3 signaling is activated in human skeletal muscle following acute resistance exercise. *J Appl Physiol* **102**, 1483-1489.
- Trenerry MK, Carey KA, Ward AC, Farnfield MM & Cameron-Smith D. (2008). Exercise-induced activation of STAT3 signaling is increased with age. *Rejuvenation research* **11**, 717-724.
- White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H & Tartaglia LA. (1997). Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. J Biol Chem 272, 4065-4071.
- Widegren U, Jiang XJ, Krook A, Chibalin AV, Bjornholm M, Tally M, Roth RA, Henriksson J, Wallberg-henriksson H & Zierath JR. (1998). Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *Faseb J* 12, 1379-1389.
- Widegren U, Wretman C, Lionikas A, Hedin G & Henriksson J. (2000). Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. *Pflugers Arch* **441**, 317-322.
- Wu Y, Ouyang JP, Wu K, Wang SS, Wen CY & Xia ZY. (2005). Rosiglitazone ameliorates abnormal expression and activity of protein tyrosine phosphatase 1B in the skeletal muscle of fat-fed, streptozotocin-treated diabetic rats. *Br J Pharmacol* 146, 234-243.
- Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV, Krook A & Zierath JR. (2001). Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. *The Journal of physiology* **536**, 273-282.
- Yu M, Stepto NK, Chibalin AV, Fryer LG, Carling D, Krook A, Hawley JA & Zierath JR. (2003). Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. *The Journal of physiology* **546**, 327-335.
- Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG & Kahn BB. (2008). Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* **283**, 14230-14241.
- Zhang F, Chen Y, Heiman M & Dimarchi R. (2005). Leptin: structure, function and biology. *Vitam Horm* **71**, 345-372.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432.

Legends to figures

Figure 1. Levels of Tyr^{1007/1008}-Jak2 (A) and Tyr⁷⁰⁵-STAT3 (B) phosphorylation, before and after a Wingate test performed 60 min after the ingestion of 75 g of glucose (black bars) or under fasted conditions (gray bars). A) Top panel: a representative western blot with the anti-phospho-Tyr^{1007/1008}-Jak2 antibody shows different levels of band densities obtained for both phosphor-Tyr^{1007/1008}-Jak2 and total Jak2 at the different time points in both experimental groups. Lower panel: densitometric analysis of immunoblots. Values are relative to total Jak2 immunosignals. B) Top panel: a representative western blot with the anti-phospho-Tyr⁷⁰⁵-STAT3 antibody shows different levels of band densities obtained for both phosphor-Tyr⁷⁰⁵-STAT3 and total STAT3 at the different time points in both experimental groups. Lower panel: densitometric analysis of immunoblots. Values are relative to total STAT3 immunosignals. All values were normalized to the average of basal ones obtained prior to the start of the Wingate test which were assigned a value of 100%. [#]*P* < 0.05 versus -60 min. **P* < 0.05 versus R. [&]*P* < 0.05 versus Glucose group. n = 8 for all points except 240 min for which n=6. The statistical analysis of Tyr⁷⁰⁵-STAT3 was performed on logarithmically transformed data.

Figure 2. Levels of Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 (A) and Thr¹⁸⁰/Tyr²⁰⁴-p38 MAPK (B) phosphorylation, before and after a Wingate test performed 60 min after the ingestion of 75 g of glucose (black bars) or under fasted conditions (gray bars). A) Top panel: a representative western blot with the anti-phospho- Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 antibody shows different levels of band densities obtained for both phospho- Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-ERK1/2 and total ERK1/2 at the different time points in both experimental groups. Lower panel: densitometric analysis of immunoblots. Values are relative to total ERK1/2 immunosignals. B) Top panel: a representative western blot with the anti-

phospho- Thr¹⁸⁰/Tyr²⁰⁴-p38 MAPK antibody shows different levels of band densities obtained for both phosphor- Thr¹⁸⁰/Tyr²⁰⁴-p38 MAPK and total p38 MAPK at the different time points in both experimental groups. Lower panel: densitometric analysis of immunoblots. Values are relative to total p38 MAPK immunosignals. All values were normalized to the average of basal ones obtained prior to the start of the Wingate test which were assigned a value of 100%. [#]P < 0.05 versus -60 min. *P < 0.05 versus R. n = 8 for all points except 240 min for which n=6.

Figure 3. Levels of SOCS3 (A) and PTP1B (B) protein expression, before and after a Wingate test performed 60 min after the ingestion of 75 g of glucose (black bars) or under fasted conditions (gray bars). A) Top panel: a representative western blot with the anti-SOCS3 antibody shows different levels of band densities observed at the different time points in both experimental groups. Lower panel: densitometric analysis of immunoblots. Values are relative to alpha-tubulin immunosignals. B) Top panel: a representative western blot with the anti-PTP1B antibody shows different levels of band densities observed at the different levels of band densities observed at the different levels of band densities observed at the different time points in both experimental groups. Lower panel: densitometric analysis of immunoblots. Values are relative to alpha-tubulin imbunosignals. B) Top panel: a representative western blot with the anti-PTP1B antibody shows different levels of band densities observed at the different time points in both experimental groups. Lower panel: densitometric analysis of immunoblots. Values are relative to alpha-tubulin immunosignals. All values were normalized to the average of basal ones obtained prior to the start of the Wingate test which were assigned a value of 100%. **P* < 0.05 versus R. $^{\&}P < 0.05$ versus Glucose group. n = 8 for all points except 240 min for which n=6.

	Control	group (n=7)	Glucose Group (n=8)		
	Mean	SD	Mean	SD	
Age (years)	23 ±	2	23	± 2	
Height (cm)	176.2 ±	9.1	180.1	± 3.9	
Body mass (kg)	78.1 ±	10.4	76.9	± 6.3	
% body fat	17.7 ±	6.6	12.0	± 7.2	
Pmax (W)	1018.6 ±	138.7	1032.2	± 135.2	
Pmax (W/kg body mass)	13.2 ±	2.1	13.3	± 1.4	
Pmean (W)	676.9 ±	91.1	706.9	± 37	
Pmean (W/kg body mass)	8.7 ±	1.1	9.2	± 0.7	

 Table 1. Physical characteristics and performance.

All P > 0.05

	-60 min	R	0	30 min	120 min	240 min	Group by time
Control Group	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	mean \pm SD	mean \pm SD	$mean \pm SD$	$mean \pm SD$	interaction
Glucose (mg/dL) (n=7)		91.04 ± 9.0	$101.2\pm7.3^{\&}$	$105.9 \pm 8.3^{*\&}$	$95.4\pm14.8^{\&}$	107.2 ± 5.8	P<0.05
Insulin (µU/mL) (n=7)		6.4 ± 3.3	$10.1\pm7.4^{\&}$	$14.3 \pm 2.7^{*}$	5.3 ± 2.0	9.2 ± 2.7	P<0.05
HOMA (n=7)		$1.5\pm0.8^{\&}$	$2.5\pm2.0^{*}$	$3.7\pm0.7^{*}$	1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.6	P<0.05
Leptin (ng/mL) (n=7)		4.1 ± 3.7	3.9 ± 3.2	3.8 ± 3.4	$3.4\pm2.9^{*}$	$3.0\pm3.2^*$	P=0.06
Glucose Group							
Glucose (mg/dL) (n=6)	82.5 ± 3.2	92.3 ± 27.7	83.2 ± 13.4	$70.0\pm9.8^*$	70.5 ± 9.0	84.8 ± 3.9	P<0.05
Insulin (µU/mL) (n=6)	6.6 ± 5.6	$23.8 \pm 19.1^{\#}$	$23.0\pm6.7^{\#}$	$8.2 \pm 4.2^{*\&}$	$3.5\pm2.0^{*}$	$2.6\pm1.7^*$	P<0.05
HOMA (n=6)	1.4 ± 1.2	$6.4\pm7.6^{\#}$	$4.7\pm1.8^{\#}$	$1.5\pm0.9^{*}$	$0.6\pm0.4^{*}$	$0.6\pm0.4^{*}$	P<0.05
Leptin (ng/mL) (n=8)	2.3 ± 4.2	2.6 ± 1.7	1.0 ± 1.4	$0.9 \pm 1.2^{*}$	$0.7\pm1.0^{*}$	$0.8\pm1.0^{*}$	P=0.06

Table 2. Serum glucose, insulin and leptin concentration before and during the recovery period after sprint exercise in both groups.

*P < 0.05 versus R (resting just prior to exercise); *P < 0.05 versus -60min. *P < 0.05 versus glucose group.



Figure 1



Figure 2



Figure 3