

**D. ANTONIO S. RAMOS GORDILLO, SECRETARIO
DEL DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN FÍSICA DE LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 19 de marzo de 2009, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "*Influencia del polimorfismo del receptor de andrógenos en la masa muscular y la masa ósea y en la respuesta hipertrófica al entrenamiento de fuerza en hombres y mujeres*" presentada por la doctoranda D^a. Amelia Guadalupe Grau y dirigida por los Doctores D. José A. López Calbet, D^a. Cecilia Dorado García y D. Carlos B. Guerra Hernández.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Art. 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a veinticuatro de marzo de dos mil nueve.




UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: EDUCACIÓN FÍSICA

Programa de Doctorado: “ACTIVIDAD FÍSICA, SALUD Y RENDIMIENTO DEPORTIVO”

Título de la Tesis

“INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN LA MASA MUSCULAR Y LA MASA ÓSEA Y EN LA RESPUESTA HIPERTRÓFICA AL ENTRENAMIENTO DE FUERZA EN HOMBRES Y MUJERES.”

Tesis Doctoral presentada por D^a. Amelia Guadalupe Grau.

Dirigida por el Dr. D. José Antonio López Calbet.

Codirigida por la Dra. D^a. Cecilia Dorado García.

Codirigida por el Dr. D. Carlos Borja Guerra Hernández.

El Director,

(firma)

Los Codirectores

(firma)

La Doctoranda,

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, 2009

Agradecimientos.

Esta tesis nunca hubiera podido ser realizada sin la ayuda de los integrantes del grupo de investigación "*Rendimiento Humano, Ejercicio físico y Salud*" de la Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Todos y cada uno de ellos han contribuido según su perfil profesional con ayuda siempre eficaz y desinteresada. En primer lugar, me gustaría agradecer al profesor José Antonio López Calbet, puesto que fue el encargado de despertar en mí la inquietud científica y el amor a la Ciencia desde la primera clase que tomé como alumna de la asignatura Fisiología del Ejercicio. Gracias por confiar en mi potencial investigador, brindarme la oportunidad de trabajar con importantes grupos de investigación de fama internacional como los ubicados en el Copenhagen Muscle Research Center (CMRC), así como asistir a congresos europeos y americanos, por ayudarme siempre y en cualquier momento del día o de la noche... Al doctor Carlos Borja Guerra Hernández, quien infundió en mí el interés por la biología molecular y me ha enseñado todo lo que sé sobre técnicas de esta ciencia, un compañero y un gran amigo que siempre me ha prestado su apoyo y ha ayudado en gran medida a la corrección de esta tesis. Al doctor Alfredo Santana, por prestarme su ayuda en varios aspectos de esta tesis. A Bonifacio Nicolás Díaz Chico, ya que sin su apoyo no habría sido posible realizar las determinaciones del polimorfismo del receptor de andrógenos. A Henriette Pilegaard y Beng Saltin, por las enseñanzas y atenciones recibidas durante mi estancia en el CMRC. A los profesores Cecilia Dorado, Javier Chavarren, José Antonio Serrano y Rafael Arteaga por ayudarme en todo lo que necesité. A José Navarro, por darme siempre buenos consejos y poner a mi disposición todos los medios técnicos necesarios para los estudios. A Hugo Olmedillas, que empezó esta empresa conmigo, ha sido un gran compañero de trabajo y del que he aprendido mucho. A Germán Vicente, que me guió por mis primeros pasos en el laboratorio. A Teresa Fuentes, con quien he formado un fabuloso tándem para sacar trabajo adelante con esfuerzo y dedicación. A David Morales y Jesús Ponce, quienes son ahora el futuro del laboratorio.

A todos los sujetos que formaron parte en los estudios recogidos en esta tesis (Cuerpo de Policía Local de Las Palmas de Gran Canaria, estudiantes de Educación Física e integrantes de diversos clubes deportivos), sin ellos, esta tesis sin duda no hubiera podido ser realizada.

A todos los amigos que han sido cómplices en este proyecto, sabiendo dar un consejo y una palabra de apoyo siempre que lo he necesitado.

Un especial agradecimiento merece mi familia. A los que ya no están pero no caen en el olvido, a mis abuelos y tíos, y en especial, a mis padres y hermanas, quienes siempre han confiado en mí, animándome en horas bajas, enorgulleciéndose de mi trabajo y respetando siempre mis decisiones.

Gracias a todos.

La presente tesis se basa en las siguientes publicaciones:

- I. Amelia Guadalupe-Grau, Teresa Fuentes, Borja Guerra, Jose Antonio Lopez Calbet. **Exercise and bone mass in adults.** Sports Medicine. (En prensa).
- II. Amelia Guadalupe-Grau, Jorge Pérez-Gómez, Hugo Olmedillas, Javier Chavarren, Cecilia Dorado, Alfredo Santana, Jose Antonio Lopez Calbet. **Strength training combined with plyometric jumps in adults: Gender differences in fat-bone axis adaptations.** J Appl Physiol (En prensa).
- III. Amelia Guadalupe-Grau, F. Germán Rodríguez-González, Cecilia Dorado, Teresa Fuentes, Jorge Pérez-Gómez, Hugo Olmedillas, Safira Delgado-Guerra, Germán Vicente-Rodríguez, Ignacio Ara, Borja Guerra, Rafael Arteaga-Ortiz, José A L Calbet, B. Nicolás Díaz-Chico. **Androgen receptor gene polymorphisms influence muscle mass and performance in humans.**
- IV. Amelia Guadalupe-Grau, Francisco German Gonzalez-Rodríguez, Cecilia Dorado, Teresa Fuentes, Jorge Perez-Gomez, Hugo Olmedillas, Joaquin Sanchis Moysi, Bonifacio Nicolas Diaz Chico, José A L Calbet. **Free testosterone, CAG and GGN androgen receptor polymorphisms and bone mass young adults.**

ABREVIATURAS

Akt: Proteína quinasa B.

AMPK: Proteína quinasa activada por adenosin monofosfato.

AR: Receptor de andrógenos, del inglés “androgen receptor”.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: Adenosín trifosfato.

BMC: Contenido mineral óseo, del inglés “*bone mineral content*”.

BMD: Densidad mineral ósea, del inglés “*bone mineral density*”.

Ca²⁺: Ión calcio.

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico.

CMJ: Salto con contramovimiento, del inglés “*countermovement jump*”.

CSA: área de sección transversal del músculo, del inglés “*cross-sectional area*”.

DHT: dihidrotestosterona.

DPD: Desoxipiridolina.

DXA: Absorciometría fotónica dual de rayos X, del inglés “*dual energy X-ray absorptiometry*”.

EE: Extremidades.

EEII: Extremidades inferiores.

EESS: Extremidades superiores.

eIF: Factor de iniciación eucariota.

ELISA: Técnica para la medición de la concentración sérica de hormonas, del inglés “*Enzyme Linked Immunoabsorvent Assay*”.

EMG: Actividad electromiográfica.

ER α : Receptor de estrógenos alfa, del inglés “*estrogen receptor*”.

ER β : Receptor de estrógenos beta, del inglés “*estrogen receptor*”.

ERA: Elementos de respuesta a andrógenos.

ERK 1 y 2: Quinasas de regulación extracelular 1 y 2, del inglés “*Extracellular Regulated Kinases*”.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico.

FIM: Fuerza isométrica máxima.

FN: cuello del fémur, del inglés “*femoral neck*”.

FOXO: Familia de factores de transcripción “*fork-head box O*”.

FT: Testosterona libre, del inglés “*Free testosterone*”.

GH: Hormona del crecimiento, del inglés “*growth hormone*”.

GSK-3 β : Quinasa de la proteína glucógeno sintasa-3 β .

HFES: estimulación eléctrica de alta intensidad, del inglés “*high frequency electric stimulation*”.

HS: Media sentadilla, del inglés “*half squat*”.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

IL-1: Interleucina 1 (o interleuquina 1).

IL-1 β : Interleucina 1 β (o interleuquina 1 β).

IL-6: Interleucina 6 (o interleuquina 6).

IL-11: Interleucina 11 (o interleuquina 11)..

ILP: Prensa inclinada, del inglés *“inclined leg press”*.

JAK: Quinasa de Janus.

L1-L4: De la primera a la cuarta vértebra lumbar.

L2-L4: De la segunda a la cuarta vértebra lumbar.

LC: Flexiones de piernas, del inglés *“leg curl”*.

LE: Extensión de piernas, del inglés *“leg extension”*.

LFES: estimulación eléctrica de baja intensidad, del inglés *“low frequency electric stimulation”*.

LS: columna lumbar, comprendiendo las vértebras lumbares 1 a 4.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

MHC: Cadena pesada de miosina, del inglés *“myosin heavy chain”*

MME: Masa muscular de las extremidades.

MMA: Masa muscular de los brazos.

MP: Potencia media, del inglés *“mean power”*.

MRF: Factores de regulación miogénicos.

mTOR: Proteína quinasa de mamíferos diana de la rapamicina.

OPG: osteoprotegerina.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PI: Impulso mecánico positivo.

PI-3K: Quinasa de fosfatidilinositol-3 (*Phosphatidylinositol-3*).

PTH: Hormona paratiroidea.

PYD: Piridolina.

p70 S6K: Proteína ribosómica de 70 kDa.

RE: Entrenamiento de fuerza, del inglés *“resistance training”*

RFD: Velocidad de desarrollo de la fuerza, del inglés *“rate of force development”*.

SD: Desviación estándar, del inglés *“standard deviation”*

SDS-PAGE: Electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida con SDS, del inglés *“Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”*.

SHBG: globulina transportadora de hormonas sexuales, del inglés *“sex hormones binding globulin”*

SJ: Salto sin contramovimiento, del inglés *“squat jump”*.

T: Testosterona

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta, del inglés *“transforming growth factor”*

UEO: Unidad estructural ósea.

VJH: Altura de vuelo alcanzada en el salto, del inglés "*vertical jump height*".

VO_{2máx}: Consumo máximo de oxígeno.

WBBMC: Contenido mineral óseo del cuerpo entero, del inglés "*whole body bone mineral content*".

1RM: Fuerza dinámica máxima.

4E-BP1: proteína de unión 1 en la localización 4E del factor de iniciación eucariota.

Δ : incremento.

Resumen general.

El entrenamiento de fuerza es una herramienta segura y eficaz no sólo para la preparación del deportista de alto nivel, sino también para la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades que cursan con pérdida de masa muscular como es la sarcopenia, además de enfermedades que cursan con pérdida de masa ósea, como la osteoporosis. Las fracturas óseas asociadas a la osteoporosis afectan a gran parte de la población mundial, y la práctica de un entrenamiento de fuerza durante la edad adulta podría disminuir su prevalencia a edades más avanzadas.

Esta tesis tiene como principal objetivo determinar, desde una perspectiva genética, parte de la variabilidad en ciertos componentes de la composición corporal como son la masa muscular y la masa ósea, con la finalidad de esclarecer los mecanismos que producen la hipertrofia muscular tras un entrenamiento de fuerza. También se examina el efecto hipertrófico y osteogénico de un entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos en hombres y mujeres jóvenes, con el fin de determinar si existe un dimorfismo sexual en la respuesta hipertrófica y osteogénica al entrenamiento de fuerza. Para comprobar el efecto de la actividad física sobre la masa ósea, se realizó una revisión bibliográfica sobre los estudios publicados en la literatura científica actual que incluyeran el efecto de la práctica de actividad física sobre la masa ósea. Para determinar si existe dimorfismo sexual en la respuesta osteogénica al entrenamiento de fuerza, se examinaron los efectos de nueve semanas de entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos en 66 hombres y mujeres jóvenes y sanos, subdivididos en grupos control (no realizaron entrenamiento) y grupos entrenamiento. Para determinar el efecto de ciertos polimorfismos del gen del receptor de andrógenos sobre la masa muscular y ósea, se estudió una muestra poblacional de 282 hombres y 61 mujeres jóvenes y sanos.

La composición corporal se determinó mediante absorciometría fotónica dual de rayos X (DXA) y antropometría. La condición física se evaluó mediante pruebas de carrera para medir la velocidad de carrera en 30 m, así como para estimar la capacidad anaeróbica (test de carrera de 300 m), y la potencia aeróbica (*Course Navette*). Además, se determinó la potencia muscular de las extremidades inferiores mediante test de salto vertical con y sin contramovimiento (SJ y CMJ); y la fuerza isométrica y dinámica máxima de las extremidades inferiores mediante una plataforma de fuerzas. En 25 sujetos se obtuvieron biopsias musculares del vasto lateral del cuádriceps para determinar la distribución de fibras musculares. También se realizaron determinaciones hormonales séricas de osteocalcina, testosterona libre y cortisol mediante la técnica *ELISA*. El número de repeticiones de los polimorfismos CAG (poliglutamina) y GGN (poliglicina) del gen del receptor de andrógenos se determinó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Teniendo en cuenta la distribución alélica, la población estudiada se dividió en los siguientes grupos: CAG corto (*short*) (CAGs): aquellos sujetos con repeticiones CAG ≤ 22 en mujeres y ≤ 21 en

hombres. CAG largo (*long*) (CAG_L): si $CAG > 22$ en mujeres y > 21 en hombres. GGN corto (*short*) (GGN_S) si los sujetos cumplían la condición de número de repeticiones $GGN \leq 23$ tanto en hombres como en mujeres y GGN largo (*long*) (GGN_L) si $GGN \geq 23$ en ambos sexos. Los resultados obtenidos se analizaron mediante pruebas t, ANOVA para medidas repetidas, correlaciones bivariadas y análisis de regresión múltiple.

En general, se observó que el entrenamiento de fuerza produce una hipertrofia muscular (4-5%, $P < 0.01$), similar en hombres y mujeres. Esta hipertrofia se asoció a una mejora significativa de las variables de condición física, también similar en ambos sexos. La concentración en sérica de osteocalcina aumentó tras el entrenamiento de fuerza en un 45% en los hombres y en un 27% en las mujeres (efecto del tiempo ANOVA $P < 0.01$), mientras que permaneció sin cambios en los sujetos control (interacción ANOVA grupo x tiempo $P < 0.01$). Sin embargo, las diferencias observadas en el incremento de la concentración de osteocalcina entre hombres y mujeres no fueron estadísticamente significativas. El contenido mineral óseo (BMC) del cuerpo entero (WBBMC) y de la columna lumbar (LSBMC) se vió incrementado con el entrenamiento tanto en hombres como en mujeres en un rango de 0.8-2% comparado con el grupo control. La densidad mineral ósea (BMD) del cuerpo entero aumentó significativamente en los hombres del grupo entrenamiento (desde 1.25 ± 0.07 a 1.26 ± 0.07 ; $gr \cdot cm^{-2}$ $P < 0.01$) lo cual reveló una interacción significativa en función del grupo y del género ($P < 0.02$). El entrenamiento de fuerza también produjo un aumento en la proporción de cadenas pesadas de miosina (MHC) tipo IIa (+22%, $P < 0.01$) y una disminución en la cantidad de MHC tipo I (-9%, $P < 0.02$) y MHC tipo IIx (-89% $P < 0.05$) en los hombres. Además, se observó una correlación positiva entre el porcentaje de MHC tipo II al comienzo del programa de entrenamiento y el incremento en la concentración de osteocalcina con el entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos ($r = 0.50$, $p < 0.05$, $n = 22$).

En cuanto a los polimorfismos del gen del receptor de andrógenos, observamos que la masa muscular libre de grasa en el cuerpo entero fue un 5.9% mayor en las mujeres con el polimorfismo CAG_S en comparación con las mujeres del grupo CAG_L (medias ajustadas por la talla²: 15.3 ± 1.2 vs 14.4 ± 1.1 $kg \cdot m^{-2}$, $P = 0.009$). Las mujeres con el polimorfismo CAG_S también corrieron el test de 300m un 6.7% más rápido ($P < 0.05$) que las mujeres CAG_L . En las mujeres, se obtuvo una correlación inversa entre el logaritmo del número de repeticiones del polimorfismo GGN y la masa muscular de los brazos (MMA), expresado tanto en valor absoluto, como en $Kg \times talla^{-2}$, significando que el número de repeticiones GGN puede explicar un 7.7 y 8.8 % respectivamente, de la variabilidad en la masa muscular de los brazos en las mujeres. La altura de vuelo en los saltos tipo squat y con contramovimiento también correlacionó negativamente con el número de repeticiones del polimorfismo GGN ($r = -0.28$ y $r = -0.32$, ambos $P < 0.05$), implicando que las repeticiones GGN pueden explicar un 7.6 y 10.4% respectivamente, de la variabilidad en la altura de salto de las mujeres. Se observó una correlación negativa entre el logaritmo del número de repeticiones CAG y el

BMC del cuello del fémur, el BMC del triángulo de Ward, y la BMD del triángulo de Ward en los hombres ($r_p = -0.12, -0.14$ y $-0.12, P < 0.05$). Al contrario que con la masa muscular, las mujeres con un polimorfismo CAG_L obtuvieron mayores valores de BMC y BMD en las diversas regiones esqueléticas estudiadas.

En conclusión, no existe dimorfismo sexual en la respuesta hipertrófica y osteogénica al entrenamiento de fuerza en seres humanos jóvenes y sanos. Los polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos juegan un papel importante en la variabilidad de la cantidad de masa muscular, condición física y masa ósea en hombres y mujeres.

Summary.

Strength training has become an important exercise intervention not only to improve athletic performance, but also appears to be critical in special populations (i.e. elders) to increase functional independence and to decrease the prevalence of age-associated diseases like sarcopenia and osteoporosis. Osteoporosis related fractures are a worldwide health problem. Strength training during adulthood could blunt the prevalence of these diseases latter in life. In addition, increasing bone mass during adulthood also increases life quality during senescence.

The main objective of this thesis was to determine, from a genetic perspective, to assess the influence of androgen receptor repeat polymorphisms on muscle and bone mass. To determine the role that muscle hypertrophy could play in changing bone mass, we studied the osteogenic responses in men and women after strength training combined with plyometric jumps. To evaluate the hypertrophic and osteogenic effects of strength training, nine weeks of high intensity strength training combined with plyometric jumps were investigated in 66 healthy young men and women compared with their sedentary counterparts. To evaluate the effect of some polymorphisms of the androgen receptor (AR) gene on muscle and bone mass, a population consisting in 282 men and 61 women was examined.

Bone mineral content (BMC) and areal density (BMD), lean and fat masses were assessed by dual energy X-ray absorpctiometry (DXA). Physical fitness was studied using running tests to estimate the running speed (30m), anaerobic capacity (300m) and aerobic power (20 shuttle), as well as strength tests to assess dynamic and maximal isometric force using a force plate. Serum concentrations of hormones were determined by the *ELISA* technique. Muscular biopsies were obtained from the lateral aspect of the muscle *vastus lateralis* to determinate the myosin heavy chain isoforms (MHC) distribution. The length of CAG (polyglutamine) and GGN (polyglycine) repeats of the AR was determined by PCR and fragment analysis. Individuals were grouped as CAG short (CAG_S) if harbouring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if CAG > 21 in men and > 22 in women. GGN was considered short (GGN_S) or long (GGN_L) if GGN ≤ 23 or > 23 in men and women. T-tests, ANOVA for repeated measures, Pearson correlations and multiple regression tests were applied as statistical procedures.

In general, the serum concentration of osteocalcin in healthy young men and women was positively correlated ($P < 0.05$) with: whole body BMC ($r = 0.31$) and lean mass (LM) ($r = 0.43$), lower extremities BMC ($r = 0.36$), lower extremities BMD ($r = 0.29$), and LM ($r = 0.42$), and 1RM in inclined leg press ($r = 0.28$), leg extension ($r = 0.27$), and leg curl ($r = 0.35$), and serum free testosterone concentration ($r = 0.32$). Both genders experienced similar relative improvements in performance, LM (+4-5%), whole body (+0.78%) and lumbar spine BMC

(+1.2-2%) with training. Serum osteocalcin concentration was increased after training by 45 and 27% in men and women, respectively ($P<0.05$).

In men, no significant differences in lean body mass or fitness were observed between the CAG_S and CAG_L groups, but a borderline correlation was found for the GGN repeat and lean mass of the extremities ($r=-0.11$, $P=0.06$). Women from the CAG_S group had 5.9% greater whole body lean mass ($P=0.009$), ran 300 m 7.9% faster and jumped up 10.4 % higher than those from the CAG_L group ($P=0.05$). In women, the CAG repeat number correlated with the maximal isometric force (MVC) normalized per kg of muscle mass of the lower extremities ($r=-0.33$, $P=0.03$) and with VO_{2max} ($r=0.27$, $P=0.04$). Men harbouring the combination CAG_S and GGN_S jumped 9% higher than those having the combination CAG_L and GGN_L ($P<0.05$).

There is an inverse association between CAG repeat length and femoral neck BMC ($r=-0.12$, $P<0.05$) and BMD ($r=-0.12$, $P<0.05$) in men. In women, neither the CAG nor the GGN repeat length were associated to BMC nor BMD in any of the regions examined. Men and women with CAG_L + GGN_L haplotypes, which potentially have lower androgen responsiveness, had greater BMC (+6.3%) and BMD (+4.4%) at the lumbar spine than men or women harbouring CAG_S + GGN_S haplotypes ($P<0.05$). However, femoral neck BMD was 4.8% higher in men with CAG_S + GGN_S compared with CAG_L + GGN_S haplotypes ($P<0.05$). Serum free testosterone accounts for 4.6% of the variability in femoral neck BMD and CAG repeat length for another 1.4%. In contrast to men, women with CAG_L + GGN_S or CAG_S + GGN_L haplotypes have higher BMD than those harbouring CAG_S + GGN_S haplotypes ($P<0.05$). A sex dimorphism was also observed in the upper extremities where women with CAG_L + GGN_S showed higher BMC (+15%) and BMD (+11.3%) than CAG_S + GGN_S women ($P<0.05$). In men, CAG and GGN haplotypes had no significant influence on BMC and BMD of the extremities.

Although free testosterone levels were not influenced by the CAG and GGN repeat length in men, in women there was an inverse association between serum free testosterone concentration and CAG repeat length ($r=-0.26$, $P=0.05$).

In summary, the studies included in this PhD thesis show that the relative effects of strength training combined with plyometric jumps on performance, muscle hypertrophy and osteogenesis are similar in men and women. In addition, we have shown that the length of CAG and GGN repeat of the AR gene influences the muscle mass, muscle strength and performance in young men and women, being the combination CAG_S and GGN_S the most advantageous for strength and power development, particularly in women. Furthermore, CAG and to lesser extent GGN androgen receptor polymorphisms have an influence on bone mass and bone mineral density, which is modulated depending on a number of factors among which free testosterone concentration plays a relevant role in young women, but not in young men.

ÍNDICE.

1. Introducción.....	3
1.1. Efectos del entrenamiento de fuerza sobre la masa ósea en adultos.....	4
1.1.1. Características generales del tejido óseo.....	4
1.1.2. Remodelación ósea.....	6
1.1.3. Adaptaciones a la carga mecánica del tejido óseo.....	8
1.1.4. Andrógenos y hueso.....	9
1.1.4.1. Receptores de andrógenos en las células óseas.....	10
1.1.4.2. Efectos de los andrógenos sobre las células óseas.....	11
1.1.5. Efectos de la actividad física sobre la masa ósea en adultos.....	12
1.1.5.1. Estudios transversales (cross-sectional studies).....	12
1.1.5.2. Estudios longitudinales.....	17
1.2. Efectos del entrenamiento de fuerza sobre la masa muscular en adultos.....	19
1.2.1. Características generales del tejido muscular esquelético.....	19
1.2.2. Tipos de fibra muscular.....	20
1.2.3. Biología del entrenamiento de fuerza.....	22
1.2.3.1. Mecanismos moleculares que producen hipertrofia tras un entrenamiento de fuerza.....	22
1.2.3.2. Respuestas hormonales del tejido muscular al entrenamiento de fuerza.....	26
1.2.3.3. Actividad de las células satélite.....	28
1.2.3.4. Síntesis de proteínas.....	29
1.2.3.5. Crecimiento del músculo.....	29
1.2.4. Principios del entrenamiento de fuerza y su relación con la señalización muscular.....	30
1.3. Polimorfismos del receptor de andrógenos.....	30
1.3.1. Mecanismo de acción clásico o genómico del receptor de andrógenos.	37
1.4. Hipótesis.....	39
1.5. Objetivos.....	39
2. Metodología (material y métodos).....	40
2.1. Sujetos.....	40
2.2. Mediciones.....	41
2.2.1. Condición física.....	41
2.2.2. Composición corporal.....	43
2.2.3. Muestras de sangre.....	44
2.2.4. Consentimientos y aprobación ética.....	46
2.2.5. Estadística.....	46
3. Resultados.....	47

3.1. Entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos en adultos.	47
Diferencias según el género en las adaptaciones producidas sobre el eje grasa-hueso.....	47
3.2. Ciertos polimorfismos del gen del receptor de andrógenos influyen en la masa muscular y la condición física en humanos.....	60
3.3. Testosterona libre, polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos y masa ósea en adultos jóvenes.....	76
4. Discusión general.....	87
4.1. Efectos del entrenamiento de fuerza sobre la condición física y la respuesta hipertrófica en hombres y mujeres jóvenes.....	87
4.2. Respuesta de la osteocalcina al entrenamiento de fuerza y su relación con el fenotipo muscular y la hipertrofia muscular.....	88
4.3. La respuesta osteogénica a corto plazo al entrenamiento de fuerza es similar en hombres y mujeres jóvenes.....	89
4.4. Polimorfismos del receptor de andrógenos y masa muscular libre de grasa.....	90
4.5. Polimorfismos del receptor de andrógenos y condición física.....	92
4.6. Polimorfismos del receptor de andrógenos y masa ósea.....	94
4.7. Polimorfismos del receptor de andrógenos y testosterona libre.....	95
5. Resumen y conclusiones.....	97
6. Aplicaciones y perspectivas de futuro.....	99
7. Bibliografía.....	101
8. Apéndices – estudios I-IV.....	114

1. INTRODUCCIÓN.

La incidencia de enfermedades crónicas como la osteoporosis se ha visto dramáticamente incrementada en los últimos tiempos, conllevando enormes gastos económicos para los sistemas de salud pública (Goddard and Kleerekoper 1998; Johnell and Kanis 2005; Kanis et al. 1994; Nevitt 1994). Asimismo, un estilo de vida sedentario acelera los procesos que cursan con pérdida de masa muscular durante el envejecimiento, como por ejemplo la sarcopenia (Marcell 2003). Estas patologías llevan a las personas que la padecen a la dependencia física y en última instancia a un mayor riesgo de mortalidad (Marzetti and Leeuwenburgh 2006; Roth et al. 2000; Roubenoff 2000).

El entrenamiento de fuerza es uno de los recursos más empleados para prevenir y contrarrestar el efecto de estas enfermedades. Diversos estudios han mostrado que la realización de un entrenamiento sistemático de fuerza se acompaña de incrementos significativos en la producción de fuerza y la masa muscular, independientemente de la edad y el sexo, siempre y cuando la intensidad y el periodo de entrenamiento sean suficientes (Izquierdo et al. 2006; Kraemer and Ratamess 2005; Roth et al. 2000).

Las tensiones generadas durante el entrenamiento de fuerza también provocan adaptaciones en la estructura ósea mejorando la densidad del hueso, que cuya competencia mecánica también depende de la rigidez, flexibilidad y ligereza (Guadalupe-Grau et al. 2008; Seeman and Delmas 2006). Además, el entrenamiento de fuerza reduce el riesgo de caídas y por consiguiente de fracturas, ya que produce una mejora en la propiocepción (DiBrezza et al. 2005; Kraemer et al. 2002; Schlicht et al. 2001), contribuyendo al bienestar físico de las personas que lo practican (Olson et al. 2006; Reeves et al. 2006; Suominen 2006).

La hipertrofia muscular y ósea provocada por el entrenamiento de fuerza resulta de la integración de múltiples estímulos, entre ellos los más importantes son: el ejercicio *per se*, cambios hormonales locales y sistémicos ocasionados por el ejercicio, así como factores nutricionales (Bolster et al. 2004; Dunn et al. 1999; Glass 2003; Hornberger et al. 2004).

Tanto el proceso de hipertrofia muscular como la atrofia muscular están regulados dependiendo de la activación-represión de genes claves de las fibras musculares (Bolster et al. 2004; Brostrom and Brostrom 2003). Por lo tanto, parte de la respuesta hipertrófica al ejercicio puede estar modulada en función de la presencia de ciertas variantes de receptores hormonales (polimorfismos) que intervienen en el proceso de activación o represión de la respuesta hipertrófica muscular (Grundberg et al. 2004). Determinados polimorfismos del gen que codifica para la miostatina permiten explicar parte de la variabilidad en la respuesta hipertrófica muscular ejercicio en mujeres (Ivey et al. 2000). También se ha observado que ciertos polimorfismos del gen del receptor nuclear de la vitamina D se asocian a una mayor masa muscular en seres humanos (Grundberg et al. 2004; Roth et al. 2004). Igualmente, algunos polimorfismos del gen del receptor de andrógenos se asocian con la masa magra en hombres (Walsh et al. 2005). Sin embargo, se desconoce si polimorfismos del receptor

de andrógenos influyen en la respuesta hipertrófica muscular al ejercicio o si existe alguna relación entre estos polimorfismos y la masa muscular, masa ósea, factores endocrinos y variables de condición física.

1.1. EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO DE FUERZA SOBRE LA MASA ÓSEA EN ADULTOS.

1.1.1 Características generales del tejido óseo.

El tejido óseo forma el esqueleto cuyas principales funciones son tres. Primero, constituye un soporte mecánico al proporcionar un almacén al organismo sobre el que se organiza la estructura corporal, además, proporciona elementos rígidos que protegen a órganos vitales y puntos de anclaje para los músculos, necesarios para la transmisión de fuerzas. Segundo, acomoda en su interior a la médula ósea. Tercero, tiene una función metabólica crucial para el mantenimiento del balance hidroelectrolítico y ácido-base, pues el tejido óseo constituye una gran reserva corporal de fosfato y calcio. El tejido óseo, está compuesto básicamente por una parte orgánica (20-25% del peso total), otra inorgánica (75%) y en torno a un 5% de agua. La matriz orgánica u *osteoides* determina la estructura y las propiedades bioquímicas y mecánicas del hueso. El osteoide está compuesto en un 98% por colágeno tipo I y una sustancia fundamental que contiene glicosaminoglicanos. Las células propias del tejido óseo completan el 2% restante. La parte inorgánica del hueso está formada por sales de calcio que forman principalmente cristales de hidroxapatita que constituyen la fase mineralizada del hueso. En menor cantidad se encuentra el fósforo, sodio, potasio, zinc y magnesio (Lian 1999).

En el hueso podemos distinguir dos estructuras superficiales en las que el hueso entra en contacto con otros tejidos: la superficie perióstica externa y la superficie endóstica interna. El remodelado o reorganización de la estructura ósea tiene lugar en estas dos superficies. En estado quiescente estas superficies están recubiertas por una membrana colagenosa sobre la que se encuentra una capa de células de revestimiento, integrada por dos tipos fundamentales de células: osteoblastos y osteoclastos. En el hueso, en condiciones normales, hay una mayor cantidad de osteoblastos que de osteoclastos (Lian 1999).

Los osteoblastos son células formadoras de hueso y se encargan de secretar la matriz ósea orgánica (osteoides) compuesta por fibras de colágeno, proteoglicanos y moléculas más pequeñas como la osteocalcina, osteonectina y osteopontina (Geneser 2000; Lian et al. 1999; Lian 1999). Además, los osteoblastos producen vesículas ricas en iones Ca^{2+} y PO_4^- y en enzimas imprescindibles para la mineralización como la fosfatasa alcalina (Geneser 2000; Junqueira 2000; Kanis 1996). Esta enzima se encuentra también en la membrana osteoblástica (Naylor 1999). Por otra parte, los osteoblastos secretan factores de

crecimiento, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), y citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11 (IL-1, IL-6, IL-11), con un efecto directo y local sobre la formación y resorción del hueso (Lian 1999). Cuando el osteoblasto termina su actividad productora de hueso, pasa a un estado de inactividad, formando una capa que recubre la matriz osificada. En este estado, el osteoblasto recibe el nombre de célula de recubrimiento óseo u osteocito de superficie. Además, cierto número de osteoblastos quedan atrapados dentro del hueso compacto, pasando a denominarse definitivamente osteocitos (Lian 1999).

Los osteocitos se mantienen vivos y siguen en contacto con las células vecinas a través de prolongaciones citoplasmáticas. Estas células presentan un aparato de Golgi desarrollado y parte del retículo endoplasmático rugoso de su progenitor. Existe cierta controversia sobre la función de los osteocitos. En este sentido se ha especulado con la posibilidad de que reabsorban matriz ósea liberando Ca^{2+} , pero no existen datos concluyentes al respecto. No obstante, las evidencias apuntan a que desempeñan una función imprescindible en la transmisión de información sobre el estado interno del hueso hacia la superficie (Lian 1999). De esta forma, los osteocitos son capaces de percibir señales generadas por el estrés que producen las fuerzas mecánicas aplicadas sobre el hueso, lo que se ha demostrado por cambios rápidos en su actividad metabólica (Burger and Klein-Nulend 1999; el Haj et al. 1990; Pavalko et al. 1998; Skerry et al. 1989), y en la expresión de IGF-1 (Lean et al. 1995). Posteriormente, los osteocitos hacen llegar estas señales a los osteoblastos de la superficie.

Los osteoclastos son células polinucleadas de gran tamaño, que provienen de células hematopoyéticas de la línea monocito/macrófago. Los osteoclastos, al contrario que los osteoblastos, actúan reabsorbiendo hueso y formando pequeñas cavidades en la superficie ósea llamadas *lagunas de reabsorción de Howship*. La resorción osteoclástica está mediada por la producción de hidrogeniones, anhidrasa carbónica y fosfatasa ácida tartato resistente que aumentan la solubilidad del mineral óseo. Tanto la hormona paratiroidea (PTH) como la vitamina D en su forma activa ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), que tiene un comportamiento similar al de una hormona, tienen una gran influencia en múltiples estados de la diferenciación celular ósea y en la actividad osteoclástica (Lian 1999). En los osteoblastos hay receptores para PTH y vitamina D. Los osteoblastos sintetizan citoquinas (IL-1, IL-6, IL-11) en respuesta a la activación de sus receptores sensibles a la PTH y a la vitamina D. A su vez, las citadas citoquinas (IL-1, IL-6, IL-11) tienen efectos de proliferación o mitogénicos en los osteoclastos progenitores (Lian 1999). También se han encontrado receptores de PTH en los osteoclastos (Suda et al. 1992).

El colágeno, es una estructura proteica fibrilar formada a partir de la unión de fibrillas de colágeno. Cada una de las fibrillas de colágeno resulta de la polimerización de una proteína llamada tropocolágeno. Cada unidad de tropocolágeno está compuesta por unos 1000 aminoácidos dispuestos en tres cadenas polipeptídicas unidas por enlaces covalentes

de hidrógeno. Las moléculas de tropocolágeno se unen entre sí mediante enlaces intermoleculares llamados enlaces covalentes cruzados (cross-links), los cuales se establecen entre residuos de lisina en el proceso de maduración del colágeno.

Posteriormente, muchas de estas fibrillas se unen para conformar las fibras de colágeno en las cuales quedan pequeños huecos que permiten la mineralización (Lian 1999).

La osteocalcina, osteonectina, integrina, factores de crecimiento y citoquinas son las principales proteínas no colágenas integrantes de la matriz orgánica (Lian 1999).

La parte inorgánica está compuesta prácticamente en su totalidad de hidroxapatita cálcica $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (Hunter and Goldberg 1993). La hidroxapatita cálcica es una sal mineral de carácter cristalino que se forma cuando hay una concentración sobre umbral de Ca^{2+} y PO_4 (Hunter and Goldberg 1993) de tal manera que estos iones precipitan dando lugar a la hidroxapatita.

1.1.2 Remodelación ósea.

En los adultos, el tamaño del esqueleto ni aumenta ni disminuye. A pesar de ello, el hueso sufre un continuo proceso de renovación, en el que el mantenimiento de la masa ósea depende del balance entre la resorción ósea osteoclástica y la formación ósea por parte de los osteoblastos. Este proceso es denominado remodelación ósea, e incluye las fases de activación, resorción, acoplamiento y mineralización (Kanis 1996).

Activación: La atracción de un grupo de osteoclastos a un punto de la superficie ósea se denomina activación. El término hace referencia al proceso y no a la actividad de los osteoclastos en sí. La "frecuencia de activación" describe la frecuencia con la que se producen los fenómenos de activación en las superficies óseas. En el individuo sano, se produce una activación aproximadamente cada 10 segundos, y su frecuencia determinará, en gran medida, el número de nuevas áreas de remodelación del tejido óseo. Tanto la hormona tiroidea como la PTH, incrementan la frecuencia de activación, al contrario que los esteroides gonadales y la calcitonina que son inhibidores de la activación (Kanis 1996).

Resorción: Durante la fase de resorción ósea, un grupo de osteoclastos puede horadar diariamente, en la superficie del hueso esponjoso, una cavidad de hasta 20 μm . Durante esta fase, el grupo de osteoclastos produce una cavidad de erosión de unos 40-60 μm en un período de 4-12 días, tras lo cual desaparecen las células multinucleadas, siendo reemplazadas por células mononucleadas, que tienen una menor capacidad de resorción, por lo que se encargan de suavizar las paredes de la cavidad erosionada. Durante los siguientes 7-10 días, se deposita una capa de sustancia cementante, rica en proteoglicanos, glicoproteínas y fosfatasa ácida, pero pobre en colágeno. Esta fase se denomina "de

reversión”, y describe el período entre el cese de la resorción ósea mediada por los osteoclastos y la formación ósea (Kanis 1996).

Acoplamiento: Una vez que finalizan la resorción y la reversión, mediante un proceso denominado “acoplamiento” se produce la atracción de los osteoclastos hacia la superficie erosionada que mas adelante sintetiza una matriz osteoidea. No se conoce la señal que inicia el acoplamiento, pero puede estar mediada por células de reversión, o por la exposición de proteínas quimiotácticas, tales como fragmentos de colágeno o factores de crecimiento en transformación, dentro de la matriz ósea. La cantidad del hueso neoforado también depende de la cantidad de osteoblastos, éstos forman una capa de células dentro de la cavidad de resorción y sintetizan capaz de una matriz osteoidea constituidas por un tejido óseo no mineralizado y otras proteínas matriciales. Durante el inicio de la fase de formación la síntesis de la matriz es rápida. El osteoide recién formado posee un ordenamiento lamelar de colágeno. En el hueso esponjoso, las lamelas generalmente se disponen paralelas a las trabéculas (Kanis 1996).

Mineralización: Unos días después del inicio de la formación de la matriz por los osteoblastos, el osteoide recién formado sufre el proceso de mineralización (Eriksen 1986). El retraso entre el comienzo de la síntesis de la matriz y el inicio de la mineralización es responsable de la presencia del osteoide en el hueso normal, produciéndose en ese período la maduración del osteoide, junto con la incorporación de otras proteínas óseas. Se cree que los primeros pasos para la calcificación tienen lugar dentro o alrededor de pequeñas vesículas unidas a las membranas, las cuales son ricas en fosfatas alcalina, enzima asociada a la calcificación. Otra proteína importante para la osificación es la osteocalcina, producida exclusivamente por los osteoblastos (Lian et al. 1999). Cuando se completa la mineralización, los osteoblastos en reposo se vuelven aplastados y finalizan la secuencia de remodelación.

Los procesos de activación, reversión, formación y mineralización normalmente tienen lugar, en una pequeña parte de la superficie ósea, durante un periodo determinado, de forma que generalmente, aproximadamente el 90% de las superficies óseas disponibles están inertes. La mitad del hueso formado, denominada “unidad estructural ósea (UEO)”, requiere de varios meses para realizar los procesos de síntesis y mineralización, mientras que, en contraste, el proceso de resorción ósea osteoclástica se realiza en días, lo cual explica el por qué en la superficie ósea son mas abundantes las superficies de formación que las de resorción (Kanis 1996).

1.1.3 Adaptaciones a la carga mecánica del tejido óseo.

La fuerza del hueso depende de la cantidad de tejido, de su composición y de cómo esta composición está organizada microestructural y geoméricamente (forma y tamaño) (Bouxsein and Karasik 2006; Viguet-Carrin et al. 2006). Según Seeman y Delmas, el tejido óseo debe reunir los niveles óptimos de rigidez, flexibilidad y ligereza para ser capaz de soportar y transmitir fuerzas sin romperse. Pero no puede ser demasiado rígido, puesto que no sería capaz de absorber energía acortándose y ensanchándose cuando es comprimido, y alargándose y estrechándose cuando es sometido a tracción. Sin estas características, la energía impuesta durante la carga sería liberada mediante un fallo estructural. Por otro lado, el hueso no puede ser demasiado flexible, porque durante la carga podría deformarse fácilmente por encima de su pico de tensión y fracturarse (Seeman and Delmas 2006). Por lo tanto, el hueso es un tejido dinámico que está continuamente adaptándose a los cambios en el ambiente fisiológico y mecánico.

Las propiedades mecánicas del hueso están determinadas principalmente por dos factores: las características de la matriz de colágeno y el grado de mineralización (cantidad de cristales de hidroxapatita depositados entre las fibras de colágeno). Mientras que la rigidez está principalmente determinada por la fase mineral (Currey 1979, 1988; Currey et al. 1996; Ottani et al. 2001), la matriz de colágeno está implicada en la elasticidad (capacidad de absorber energía sin romperse) (Bailey et al. 1992; Boskey et al. 1999; Wang et al. 2001).

El colágeno que conforma el hueso, del cual un 95% es colágeno tipo I, comprende un 80% de las proteínas totales en el hueso (Niyibizi and Eyre 1994). Las fibras de colágeno están unidas entre sí mediante la formación de uniones cruzadas inter e intramoleculares. Las uniones maduras como la piridolina (PYD) y la desoxipiridolina (DPD) llegan a su máxima concentración entre los 15 y los 40 años y su concentración es menor en el hueso trabecular que en el hueso cortical (Niyibizi and Eyre 1994). Sin embargo, si existen demasiadas uniones la capacidad de absorber energía disminuye (el hueso se vuelve más quebradizo) (Eyre et al. 1988).

En humanos, se ha demostrado que la capacidad compresiva del hueso está correlacionada, independientemente de la densidad mineral ósea (BMD), con el ratio PYD/DPD, pero no con estas uniones por separado (Fantner et al. 2004). Por otro lado, la función de la matriz orgánica no fibrilar es actuar como un pegamento que mantiene las fibrillas mineralizadas juntas (Banse et al. 2002).

La fuerza del hueso también depende de la orientación de las osteonas (y de las fibras de colágeno) dentro del hueso cortical (Hert et al. 1994). Podemos encontrar las fibras longitudinales en las regiones que soportan cargas tensionales, mientras que las fibras transversales se encuentran en regiones bajo cargas compresivas (Martin and Boardman 1993; Viguet-Carrin et al. 2006). Parte de la plasticidad del hueso en respuesta a las cargas depende de su capacidad para reorientar las fibras de colágeno. Por ejemplo, se ha

demostrado que a pesar de una reducción de un 10% en el BMD en perros tras un entrenamiento exhaustivo de carrera (hasta 40 Km por día) durante un año, las características mecánicas del hueso no cambian. Estos perros, comparados con perros sedentarios, mostraron una reorganización de las fibras de colágeno de una forma más paralela sin cambios en la concentración de las uniones cruzadas, sugiriendo que esta reorganización durante el ejercicio puede contribuir al mantenimiento de la fuerza ósea a pesar de una menor densidad mineral (Puustjarvi et al. 1999).

El ratio y magnitud de la carga mecánica son los principales factores para conseguir adaptaciones óseas, los cuales deben llegar a un nivel mínimo para obtener modificaciones estructurales en el hueso (Bailey and Brooke-Wavell 2008; Frost 1987, 1993; Frost and Jee 1992; Saxon and Lanyon 2008). En el caso de los humanos físicamente inactivos, para alcanzar ganancias en masa y densidad el hueso debe ser sometido a tensiones mecánicas por encima de aquellas experimentadas en las actividades de la vida diaria (Frost 1987). Sin embargo, la evidencia experimental indica que la intensidad de las cargas ha de ser alta, induciendo tensiones en el hueso suficientes para causar microdaños y así estimular la formación ósea a través de la reparación del tejido dañado (Burr et al. 1997; Frost 1990). Pero la intensidad no es el único estímulo para la ganancia de masa ósea tal como observaron Rubin y col. (Rubin et al. 2002; Rubin and Lanyon 1984). Estos autores demostraron en animales que vibraciones de alta frecuencia (20-50 Hz) y muy baja intensidad (<10 microtensiones), aplicadas de forma continua durante actividades tan sutiles como estar de pie, incrementan el hueso trabecular en las regiones del esqueleto que soportan carga (Rubin et al. 2002; Rubin and Lanyon 1984).

1.1.4 Andrógenos y hueso.

Los andrógenos son esteroides del tipo C-19 secretados principalmente por los testículos y las glándulas adrenales. El andrógeno más importante en los hombres es la testosterona (T), que circula por el torrente sanguíneo unida a albúmina y una proteína específica del plasma, la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG).

Los andrógenos son críticos para la diferenciación de las estructuras gonadales masculinas antes del nacimiento, para la maduración sexual durante la pubertad, y para el mantenimiento de las características sexuales secundarias y la función genital, incluyendo la espermatogénesis, en la edad adulta (Vanderschueren et al. 2004). Los hombres poseen un esqueleto de mayor tamaño y una masa muscular mayor que las mujeres, y este dimorfismo es atribuido, al menos en parte, al mayor nivel circulante de andrógenos en los hombres (Vanderschueren et al. 2004). Ya en 1948, Albright y Reifstein (1948), demostraron que los andrógenos previenen la pérdida de masa ósea y la osteoporosis en los hombres durante el envejecimiento, y participan en el desarrollo del esqueleto de hombres jóvenes (Riggs et al. 2002). Desde ese momento, y debido a que la osteoporosis afecta en mayor

medida a mujeres que a hombres, la mayoría de los trabajos de investigación sobre esteroides sexuales y masa ósea se han centrado en el efecto de los estrógenos sobre el hueso.

La testosterona es metabolizada a través del complejo enzimático citocromo P450 aromatas a 17β -estradiol, y parte del efecto de los andrógenos sobre el hueso es mediado por su aromatización a estrógenos (Khosla et al. 2002; Riggs et al. 2002). El cierre de las epífisis en la pubertad es predominantemente dependiente de los estrógenos tanto en mujeres como en hombres (Juul 2001), y también parece tener un papel más importante que la testosterona en la prevención de la pérdida de masa ósea en hombres ancianos (Falahati-Nini et al. 2000; Leder et al. 2003). Debido a estas observaciones, se ha cuestionado el papel de los andrógenos en la fisiología del tejido óseo, aunque existen receptores de andrógenos en el hueso, y se conocen efectos mediados por este receptor (Compston 2001; Vanderschueren et al. 2004).

1.1.4.1 Receptores de andrógenos en las células óseas.

Se ha observado expresión de receptores de andrógenos (AR) en cultivos de condrocitos (Carrascosa et al. 1990; Vanderschueren et al. 2004), y células del tejido cartilaginoso (Abu et al. 1997). Estos estudios han analizado la expresión de estos receptores mediante inmunohistoquímica, estudios asociativos, y técnicas de hibridación "*in situ*" (Abu et al. 1997; Carrascosa et al. 1990; Vanderschueren et al. 2004). Los AR se expresan en todos los estratos de la diferenciación celular en el cartílago de crecimiento humano a diferentes edades (Ben-Hur et al. 1997), pero sólo en estado proliferativo e hipertrófico temprano en los condrocitos de ratas sexualmente maduras, y en estado prehipertrófico en los condrocitos de ratas ancianas (van der Eerden et al. 2002a). Además, no se han observado diferencias en la expresión del AR en los condrocitos de hombres y mujeres (Ben-Hur et al. 1997; Carrascosa et al. 1990), mientras que las ratas macho tienen una expresión mayor en el cartílago de crecimiento y metáfisis del hueso durante la maduración sexual que las ratas hembras (van der Eerden et al. 2002a).

Estos hallazgos prueban que posiblemente exista un efecto directo de los andrógenos sobre el hueso durante el crecimiento longitudinal e influyan en el cierre del cartílago de crecimiento al final de la pubertad. La existencia de expresión de receptores de estrógenos alfa y beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$) en el cartílago de crecimiento humano hace posible que los andrógenos actúen también de forma indirecta en el crecimiento puberal o cierre de las epífisis mediante su aromatización a estrógenos (Bord et al. 2001; Nilsson et al. 1999).

Otras células óseas en las que se ha demostrado la existencia de AR, $ER\alpha$ y $ER\beta$ son los osteoblastos. Los AR fueron detectados por primera vez en 1989 en cultivos de osteoblastos fetales mediante la técnica "*nuclear binding assay*" (Colvard et al. 1989). Posteriormente, otros estudios han detectado expresión de ácido ribonucleico mensajero

(ARNm) y expresión proteica de los AR en osteoblastos y osteocitos (Abu et al. 1997; Wiren et al. 1997). El número de sitios de unión por célula varía en un rango desde 70 a 14.000 (Bland 2000), dependiendo de la técnica usada para esta determinación. Sin embargo, esta variación tan grande en el número de sitios de unión está dentro del rango observado en otros tejidos que poseen expresión de AR.

Las células osteoblásticas humanas del hueso cortical expresan más ARNm de los AR y tienen mayor capacidad de unión que aquellas provenientes del hueso trabecular, sin embargo no existen diferencias entre sexos (Kasperk et al. 1997a). La mayoría de los estudios, pero no todos, también muestran que los andrógenos regulan positivamente la expresión de los AR en los osteoblastos (Kasperk et al. 1997a; Wiren et al. 1999; Wiren et al. 1997).

Con respecto a ER α y ER β , estos receptores se expresan también en osteoblastos y osteocitos. Actualmente no existe un consenso en lo que respecta a la relación entre la expresión de AR, ER α y ER β durante la diferenciación de osteoblastos y osteocitos, ni tampoco sobre su localización en el esqueleto humano (Clarke and Khosla 2008).

En los osteoclastos, los AR han sido detectados en aves y ratones "*in vitro*" (Mizuno et al. 1994; Pederson et al. 1999), y en ratas "*in vivo*" (Van Der Eerden et al. 2002b), pero no en osteoclastos humanos "*in vivo*" (Abu et al. 1997). Debido a la falta de evidencias experimentales con respecto a la presencia de AR en los osteoclastos, se asume que los AR ejercen su efecto sobre la osteoclastogénesis y la resorción ósea a través de los osteoblastos o los osteocitos, pero no existen datos concluyentes al respecto.

1.1.4.2. Efectos de los andrógenos en las células óseas.

La principal función de los andrógenos es estimular el crecimiento longitudinal de los huesos mediante sus efectos directos en los condrocitos del cartílago de crecimiento, como se ha demostrado en cultivos celulares de condrocitos epifisarios bajo condiciones de incubación muy estrictas, en los que los andrógenos regulan la proliferación y diferenciación de estas células (Carrascosa et al. 1990). Asimismo, si se inyecta testosterona directamente en el cartílago de crecimiento de ratas se aumenta su anchura (Ren et al. 1989). Parte del efecto de los andrógenos sobre el crecimiento longitudinal de los huesos puede estar mediado por efectos indirectos en la función de la pituitaria, porque los andrógenos modulan la secreción de hormona del crecimiento (GH), durante la pubertad (Kerrigan and Rogol 1992).

Tanto la testosterona como la 5 α -dihidrotestosterona estimulan la proliferación de precursores osteoblásticos en cultivos celulares de diferentes especies (Kasperk et al. 1990; Kasperk et al. 1997b; Kasperk et al. 1989), pero sus efectos sobre la diferenciación son menos claros. Sin embargo, otros estudios muestran efectos estimulantes en la expresión osteoblástica de alcalina fosfatasa, colágeno tipo 1, osteocalcina y mineralización de la matriz ósea extracelular. Por lo tanto, podemos concluir que los andrógenos estimulan la

diferenciación osteoblástica (Hofbauer et al. 1998; Kasperk et al. 1997b; Kasperk et al. 1989).

Los efectos androgénicos en el hueso también están indirectamente mediados por la regulación de citoquinas y factores de crecimiento expresados localmente en el tejido óseo (Bellido et al. 1995; Kasperk et al. 1990; Kasperk et al. 1997b). En este sentido, se ha observado una regulación positiva del factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), factores de crecimiento insulino-dependientes (IGFs), que estimulan la formación ósea (Kasperk et al. 1990; Kasperk et al. 1997b), y disminuyen la expresión de IL-6, que estimula la osteoclastogénesis (Bellido et al. 1995). Los andrógenos también inhiben a la hormona PTH (Pilbeam and Raisz 1990), la producción de AMP cíclico (cAMP) (Pilbeam and Raisz 1990), estimulan la producción de interleucina-1 β (IL-1 β) (Pivrotto et al. 1995), y mejoran el efecto mitogénico del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) en cultivos de osteoblastos (Kasperk et al. 1990).

En cuanto a la dihidrotestosterona (DHT), ha sido demostrado que reduce los niveles de osteoprotegerina (OPG), la cual es un potente estimulador de la actividad osteoclástica (Hofbauer et al. 2002). Además, se une directamente a los AR en los osteoclastos y bloquea la resorción ósea en humanos, ratones y aves “*in vitro*” (Abu et al. 1997).

1.1.5 Efectos de la actividad física sobre la masa ósea en adultos.

La práctica regular de actividad física antes de la pubertad estimula el crecimiento y la hipertrofia del tejido óseo, siendo mayor la masa ósea de los niños físicamente activos que la de los niños sedentarios (Vicente-Rodriguez 2006; Vicente-Rodriguez et al. 2004a; Vicente-Rodriguez et al. 2004b). Sin embargo, ¿es posible mejorar la masa ósea de los adultos mediante un programa regular de ejercicio físico? ¿Qué tipo de ejercicio es mejor para incrementar la masa ósea de los adultos? ¿Cuáles son los niveles adecuados de intensidad, frecuencia y volumen de entrenamiento para producir estas mejoras? ¿Responden de igual forma los hombres y las mujeres a un mismo programa de entrenamiento? En el primer estudio (estudio I) sobre el que basa esta tesis doctoral se revisó ampliamente la literatura existente al respecto para intentar responder a estas preguntas. A continuación se muestran los principales hallazgos de este estudio.

1.2.5.1 Estudios transversales (cross-sectional studies).

Los estudios revisados que incluyen un análisis de la participación deportiva y mediciones de absorciometría fotónica dual de rayos x (DXA), indican en general que aquellas modalidades deportivas que implican impactos y generan tensiones altas sobre el hueso tienen el mejor potencial osteogénico (Tabla 1). Las potenciales fuerzas osteogénicas que actúan sobre los huesos axial y apendicularmente son obtenidas principalmente por las

fuerzas de reacción generadas durante los saltos, golpes, sprints, lanzamientos, bloqueos cambios rápidos de dirección y arrancadas entre otros (Guadalupe-Grau et al. 2008).

Estudios realizados en el laboratorio "Rendimiento Humano" de la ULPGC han demostrado que futbolistas amateur de entre 17 y 29 años con una historia deportiva de 12 años de media, poseen un mayor contenido y densidad mineral ósea en la columna lumbar (LS) (13 y 10% respectivamente), cuello del fémur (24 y 21%) y extremidades inferiores (16 y 10%) que los sujetos sedentarios de edad, talla y peso similares (Calbet et al. 2001). Este hallazgo concuerda con estudios realizados por otros autores con sujetos de edad similar (Wittich et al. 1998) y también mujeres jugadoras de la segunda división de fútbol (Alfredson et al. 1996).

Morel y col. (2001), analizaron la influencia de la práctica deportiva sobre la BMD en 403 hombres jóvenes (30 años de media). Esta edad es ideal para comparar mediciones de BMD, porque el pico de masa ósea ya ha sido alcanzado, y la pérdida de masa ósea debida al envejecimiento es insignificante. Los deportes en los que se obtuvieron mediciones de BMD más altos fueron fútbol, baloncesto, gimnasia deportiva, voleibol y hockey sobre hielo, mientras que otros deportes como el ciclismo, la hípica y especialmente la natación mostraron valores de BMD en el cuerpo entero similares a los del grupo control sedentario. Los nadadores, al igual que los astronautas en un viaje espacial (Hawkey 2003), actúan en un medio donde la influencia de la gravedad es baja, implicando un ínfimo impacto en las estructuras óseas, además, el sistema muscular sólo es capaz de transmitir tensiones relativamente bajas a los huesos durante este tipo de ejercicio.

Del mismo modo que Morel y col., Egan y col. (2006) estudiaron la influencia de tres modalidades deportivas (rugby, corredoras de larga distancia y *netball*), sobre la BMD en chicas de 21 años de edad de media. En este estudio se concluyó que las chicas que practicaban deporte tenían una BMD mayor que el grupo control, siendo las jugadoras de rugby las que mayor BMD mostraban en la LS (Δ 16.5%), cuello del fémur (FN) (Δ 21.7%) y cadera (Δ 13.5%). Además, se observaron correlaciones positivas entre la BMD y la masa magra muscular, la masa muscular, y el volumen de entrenamiento. Sin embargo, en mujeres, hay que tener en cuenta que un factor muy importante para la integridad ósea es una función menstrual normal, puesto que mujeres oligo/amenorréicas que practiquen deportes potencialmente osteogénicos pueden no estar obteniendo las mismas mejoras que aquellas eumenorreicas como se demuestra en un estudio realizado en chicas pospúberes deportistas (16 años media) (Nichols et al. 2007).

En lo que respecta a las extremidades superiores, también se observan efectos osteogénicos debido a las tensiones generadas en las uniones tendón-hueso durante la práctica de deportes de raqueta como el tenis (Calbet et al. 1998; Kannus et al. 1994) o *squash* (Haapasalo et al. 1994). El carácter asimétrico de estos deportes ofrece un interesante modelo para estudiar las adaptaciones tanto de los tejidos blandos como de las

estructuras óseas a las tensiones generadas durante el ejercicio en las extremidades superiores, usando el brazo no dominante como control. Basándose en una comparación “*side-to-side*”, estos estudios eliminan factores que pueden llevar a confusión como son los genéticos, hormonales, y nutricionales que frecuentemente se encuentran en los estudios de diseño transversal (Kannus et al. 1994).

En conclusión, todos los estudios de diseño transversal revisados en el estudio I apoyan la hipótesis de que los efectos osteogénicos son específicos de la zona donde se soportan las cargas y tensiones, y que aquellos deportes con mayores impactos y fuerzas contra el suelo obtienen las mejores adaptaciones óseas (Tabla 1). Además, los efectos de la práctica deportiva son similares en ambos sexos, siempre y cuando se acompañen de una función menstrual normal en las mujeres.

Tabla 1. Efectos de la práctica deportiva sobre las adaptaciones óseas en hombres y mujeres adultos jóvenes. Estudios de diseño transversal. Hombres jóvenes									
Referencia	Sujetos					Deporte	Hueso		
	N	H/M	Edad (años)	Historia Deportiva (años de media)	Volumen de entrenamiento (horas medias)		Regiones esqueléticas medidas mediante DXA	Resultados	
								BMD	BMC
(Calbet et al. 2001)	EX=33 C=19	H	19-27	EX= 12 años	7h/sem	Fútbol	WB, SP, FN, IT, GT, WT, WL	↑10% SP vs C ↑21% FN vs C ↑19% IT vs C ↑21% GT vs C ↑27% WT vs C ↑10% WL vs C	↑13% WB vs C ↑13% SP vs C ↑24% FN vs C ↑18% IT vs C ↑23% GT vs C ↑24% WT vs C ↑16% WL vs C
(Morel et al. 2001)	REX=126 RGB=110 FS=44 BB=28 SW=14	H	25-40	REX= 22 años RGB= 15 años FS= 18 años BB= 16 años SW= 11 años	8.1h/sem 8.7h/sem 9.1h/sem 8.1h/sem 8.7h/sem	Atletismo; <i>Rugby</i> ; Deportes de contacto; <i>Body Building</i> ; Natación	WB, A, WL, SP, S	↑ 10% WB RGB vs OS ↑2% WB FS vs OS ↑2% WB BB vs OS ↓8% WB SW vs OS ↑5% A RGB vs OS ↑4% A FS vs OS ↑9% WL RGB vs OS ↑1% WL FS vs OS ↓5% WL BB vs OS	
(Calbet et al. 1998)	EX=9 C=13	H	21-32	EX= 17 años	25h/sem	Tenis	WB, A, SP, FN, WT, WL	↑15% SP EX vs C ↑10-15% FN EX vs C	↑5%DAP vs NDAP
(Wittich et al. 1998)	EX=24 C=22	H	20-24	EX= 8 años	20h/sem	Fútbol	WB, WL, PR	↑11% WB vs C ↑14% PR vs C ↑14% WL vs C	↑15% WB vs C ↑25% PR vs C ↑20% WL vs C

Tabla 1. Efectos de la práctica deportiva sobre las adaptaciones óseas en hombres y mujeres adultos jóvenes. Estudios de diseño transversal. Hombres jóvenes									
Referencia	Sujetos					Deporte	Hueso		
	N	H/M	Edad (años)	Historia Deportiva (años de media)	Volumen de entrenamiento (horas medias)		Regiones esqueléticas medidas mediante DXA	Resultados	
								BMD	BMC
(Egan et al. 2006)	REX=11 RGB=30 NB=20 C=25	M	19-23	REX= 9 años RGB= 4 años NB= 4 años	8.4h/sem 4.1h/sem 3.7h/sem	Atletismo; <i>Rugby</i> ; <i>Netball</i> ;	WB, SP, LPF	↑WB All sports vs C ↑13.5% RGB WB vs C ↑16.5% SP RGB vs C ↑21.7% FN RGB vs C	
(Nichols et al. 2007)	HOAEX=21 HEX=72 ROAEX=17 RNEX=51	M	14-16	HOAEX; HEX= 6.5 años ROAEX; RNEX=6.1 años	8.6h/sem 8.5h/sem	Fútbol; Voleibol; <i>Softball</i> ; Tenis; <i>Lacrosse</i> ; Atletismo; Natación	WB, SP, WH, FN, GT	↑4% HEX WH vs HOAEX ↑7% HEX GT vs HOAEX ↑10% HEX LS vs ROAEX ↑5% HEX LS vs ROAEX	
(Alfredson et al. 1996)	EX=16 C=13		18-27		6h/sem	Fútbol	WB, SP, S, FN, WT, T, H, FD, PT	↑10.7% SP vs C ↑13.7% FN vs C ↑19.6% WT vs C ↑12.6% FD vs C ↑12% PT vs C	

Número de sujetos (N); Hombre/mujer (H/M); Sujetos que realizan ejercicio (EX); Incremento significativo $P < 0.05$ (↑); Disminución significativa $P < 0.05$ (↓); Sujetos control (C); sujetos pertenecientes a otros deportes (OS); Atletas (REX); Jugadores de *rugby* (RGB); deportes de contacto (FS); *Body builders* (BB); Nadadores (SW); Jugadores de *netball* (NB); Atletas de deportes de alto impacto oligo/amenorreicas (Fútbol, voleibol, *softball*, tenis y *lacrosse*) (HOAEX); Atletas de deportes de bajo impacto oligo/amenorreicas (atletismo, natación) (ROAEX); Atletas de deportes de alto impacto eumenorreicas (Fútbol, voleibol, *softball*, tenis y *lacrosse*) (HEX); Atletas de deportes de bajo impacto eumenorreicas (atletismo, natación) (RNEX); Cuerpo entero (WB); Columna lumbar (SP); cráneo (S); Cadera (WH); Cuello del fémur (FN); Triángulo de Ward's (WT); Tibia (T); Húmero (H); diáfisis del fémur (FD); tibia proximal (PT); Región intertrocanterea (IT); Trocánter mayor (GT); pierna (WL); Región pélvica (PR); Brazos (A); Radio (R).

1.1.5.2 Estudios longitudinales.

La principal ventaja de los estudios longitudinales es que al ser aleatorios, se evita el problema provocado por el sesgo de selección, debido a la auto-selección a los grupos de entrenamiento o control, lo cual es especialmente importante en los estudios que implican entrenamiento, puesto que los sujetos pueden estar más o menos predispuestos a realizar ejercicio. La gran mayoría de estos estudios han sido realizados en mujeres, existiendo muy pocos estudios que reúnan tanto a hombres como a mujeres así como a sus respectivos grupos control. Los estudios mas recientes que incluyen mediciones óseas y efectos de un programa de entrenamiento en hombres y mujeres se han sido incluidos en la revisión que integra el estudio I.

En resumen, no está del todo aclarado cual es el tipo de entrenamiento que obtiene los mejores resultados en lo que respecta a adaptaciones óseas en adultos, aunque la evidencia científica apuntan a una combinación de altos impactos (por ejemplo, saltos pliométricos) y ejercicios de pesas (Guadalupe-Grau et al. 2008). Por lo tanto, aquellos ejercicios que implican altos impactos, aun siendo una pequeña cantidad de ellos, parecen ser los más eficientes para la mejora de la masa ósea (Guadalupe-Grau et al. 2008).

Varios tipos de entrenamiento de fuerza (RE) han generado resultados positivos (osteogénicos), especialmente cuando la intensidad es alta o muy alta y la velocidad del movimiento elevada. Al contrario, existen otros estudios que no reportan mejoras óseas tras un programa de entrenamiento de fuerza o de resistencia (Guadalupe-Grau et al. 2008). Sin embargo, estos resultados pueden ser atribuidos parcialmente al diseño del estudio, la intensidad y duración del protocolo de ejercicio, y las técnicas usadas para la medición de la BMD (Guadalupe-Grau et al. 2008).

Recomendaciones prácticas: Cualquier programa de ejercicio que tenga como objetivo la mejora de la masa ósea tiene que tener en cuenta los siguientes factores:

(i) *Edad y género* de los sujetos. A edades prepuberales y en adultos jóvenes, las diferencias entre géneros no son muy importantes, pero a mediana edad o en la senectud, la bibliografía al respecto sugiere que las mujeres han de entrenar a intensidades superiores que los hombres para mejorar su masa ósea, manteniendo siempre un rango de seguridad para evitar lesiones (Guadalupe-Grau et al. 2008).

(ii) *Elección y orden de los ejercicios:* Puesto que la adaptación ósea está limitada a las zonas donde se recibe la carga, los ejercicios han de ser elegidos para actuar específicamente en los sitios de interés clínico, por ejemplo la columna lumbar y torácica, la cadera, especialmente el trocánter mayor, la región intertrocantérea y el cuello del fémur. La forma más sencilla y segura de someter a carga estas zonas es mediante los ejercicios de

pesas, como por ejemplo prensa de piernas, extensión de piernas, flexión de piernas, media sentadilla, extensiones de espalda con cargas y algunos ejercicios de hombro y brazos. Siempre y cuando no esté contraindicado, el programa de ejercicio debe incluir ejercicios con impactos, como por ejemplo saltar, correr, subir escaleras y esprintar. Estos ejercicios han de ser incrementados hasta llegar al máximo esfuerzo posible de acuerdo con las posibilidades específicas de cada sujeto. El tipo de ejercicio también ha de ser adecuado a la edad de los participantes, intentando mantener un riesgo de caída lo más bajo posible en las personas de edad avanzada. También se ha de tener en cuenta que el potencial osteogénico de los ejercicios de salto es reducido en mujeres postmenopáusicas, pero que éstas responden bien al entrenamiento de fuerza (Guadalupe-Grau et al. 2008).

(iii) *Intensidad*. Para mejorar la masa ósea se ha de alcanzar el umbral osteogénico o nivel de intensidad mínimo para producir una adaptación ósea que mejore la competencia mecánica. Este umbral no debe ser establecido de una forma arbitraria y varía entre los sujetos, siendo presumiblemente menor en aquellos sujetos con una masa ósea reducida (p.e. osteoporosis, osteopenia). La mayoría de los entrenamientos de fuerza que obtienen resultados positivos en la masa ósea usan intensidades entre 70-90% de la repetición máxima (1RM), siguiendo siempre una progresión adecuada de bajas a altas intensidades (Guadalupe-Grau et al. 2008).

(iv) *Frecuencia*. Usualmente se utilizan 2-3 días de entrenamiento por semana para el entrenamiento de fuerza. Sin embargo, también se han obtenido buenas respuestas adaptativas a sesiones de entrenamiento con ejercicios de salto durante 6 días por semana. Entrenamientos aeróbicos con cargas (30-60 minutos) también pueden ser utilizados de 3 a 5 días por semana, o incluso diariamente dependiendo de la experiencia y tolerancia al entrenamiento de los sujetos (Guadalupe-Grau et al. 2008).

(v) *Volumen*. En programas de entrenamiento de pesas, los grupos musculares mayores de las extremidades inferiores y superiores deben ser entrenados de una forma equivalente, sin crear un desequilibrio entre los músculos agonistas y los antagonistas. El número de repeticiones debe ser próximo al máximo posible que pueda ser realizado con una carga que permita completar 2-3 series, con un descanso entre 1 y 3 minutos. En lo que respecta al entrenamiento con ejercicios de alto impacto, no existe consenso en la literatura sobre cuántos saltos han de realizarse, sin embargo, dependiendo de la tolerancia de los sujetos, entre 50 y 100 saltos deben ser realizados en cada sesión de entrenamiento. El entrenamiento de fuerza combinado con ejercicios de alto impacto puede tener un efecto aún mayor en algunos sujetos (Guadalupe-Grau et al. 2008).

(vi) *Velocidad del movimiento*. Aunque lo más recomendable es una progresión desde velocidades medias a altas al inicio del programa de entrenamiento, tan pronto como los sujetos sean capaces de realizar ejercicio de una forma segura, con una ejecución biomecánica correcta, los movimientos deben ser realizados a la máxima velocidad de ejecución posible. Esto es debido a que las contracciones musculares explosivas son las que ocasionan mayor respuesta osteogénica (Guadalupe-Grau et al. 2008; Stengel et al. 2005).

1.2 EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO DE FUERZA SOBRE LA MASA MUSCULAR EN ADULTOS.

1.2.1 Características generales del tejido muscular esquelético.

El músculo esquelético está formado por células muy largas, multinucleadas, denominadas fibras musculares, cuyos extremos se insertan en los tendones, y estos, a su vez, en los huesos. Todo el músculo está rodeado de una vaina de tejido conjuntivo que penetra en su interior dividiendo el músculo en una serie de fascículos (cada uno de ellos puede contener hasta 1500 fibras), y también entre las fibras musculares separándolas entre sí.

El músculo esquelético ejerce genera tensión mediante su contracción, y para ello cada fibra tiene su propio aparato contráctil. Este aparato contráctil está formado por miofibrillas, que son estructuras tubulares formadas por haces de filamentos gruesos y finos orientados longitudinalmente. Los filamentos gruesos y finos proporcionan la fuerza mecánica de la contracción al deslizarse unos sobre otros. Para que esto suceda, cada filamento fino de la miofibrilla está anclado en una estructura proteica, orientada en ángulo recto con los filamentos. Vista al microscopio, lateralmente, esta estructura parece estrecha y densa y se le denomina banda Z, presentándose a intervalos regulares a lo largo de la miofibrilla. El intervalo entre dos bandas Z adyacentes se conoce con el nombre de sarcómera, considerada como la unidad de acción contráctil. Así, las miofibrillas están formadas por muchas sarcómeras yuxtapuestas longitudinalmente.

Los filamentos gruesos están dispuestos en el centro de la sarcómera. Estos filamentos gruesos están compuestos por una proteína, la miosina, que a través del microscopio electrónico se ve como un bastón largo con dos paletas en uno de sus extremos, siendo estos los denominados grupos de cabeza. Estas paletas forman los puentes cruzados entre los filamentos gruesos y finos. El ángulo entre los puentes cruzados y la porción del bastón de la molécula de miosina se hace más agudo durante la contracción muscular. Este cambio de ángulo ocurre cuando el extremo de una paleta se une a un filamento fino próximo, lo que proporciona la fuerza mecánica para estirar los filamentos finos sobre los gruesos. Esto a su vez da lugar a un acortamiento simultáneo de todas las sarcómeras en todas las fibras musculares activadas y por tanto a una contracción

muscular. Los filamentos finos están formados principalmente por una proteína globulosa denominada actina, que se dispone formando una cadena de doble hélice a modo de cadena doble de “perlas” de actina. Aunque la actina es el principal componente de los filamentos finos, existen otras dos proteínas que forman parte de la estructura y desempeñan papeles importantes en la contracción muscular. A lo largo de las escotaduras entre las dos cadenas de subunidades de actina se sitúan moléculas de una proteína globular, denominada troponina. Unida a cada troponina se encuentra una molécula de una proteína delgada fibrosa, la tropomiosina, que se sitúa a lo largo de los surcos de la doble hélice.

Por otro lado, la fibra contiene otras estructuras proteicas que juegan un papel importante en la generación de la fuerza, como la titina, que ayuda a mantener el filamento fino centrado entre dos bandas Z durante la contracción, la desmina que ayuda a mantener las miofibrillas unidas entre sí a través de la conexión entre dos bandas Z adyacentes, o la nebulina, que junto a la actina parece controlar el número de monómeros de actina unidos entre sí en un filamento fino (Gorostiaga 2005; López Chicharro and Fernandez Vaquero 2006; McArdle WD 2001).

1.2.2 Tipos de fibra muscular.

El músculo esquelético no es homogéneo, sino que está formado por fibras musculares con distintas propiedades funcionales y metabólicas, que 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. Las 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. Para la recuperación de ATP las fibras tipo II dependen, en gran medida, de un sistema glucolítico bien desarrollado. 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 Vaquero 2006; McArdle WD 1991). 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 Vaquero 2006; McArdle WD 1991).

Por otro lado, 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 (MHC), de las fibras musculares aisladas. Sin embargo, trabajos más recientes han revelado que con ésta técnica sólo se puede identificar la isoforma de MHC 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 MHC (Staron and Pette 1987), la histoquímica de la ATPasa podría no ser una técnica suficientemente sensitiva para reflejar las características contráctiles de cada fibra. Por ello, se han desarrollado técnicas más sensibles, como la electroforesis y la inmunohistoquímica, para determinar la proporción de isoformas MHC contenidas en una fibra. Según estas técnicas, las isoformas de MHC 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 MHC es el más capacitado para el desarrollo de fuerza y potencia (Iix>Ila>I) (Bottinelli et al. 1999). Además, la velocidad de acortamiento de las fibras tipo Iix es aproximadamente 10 veces mayor que las de tipo I MHC (Bottinelli et al. 1999).

En cuanto a la distribución muscular de estas fibras, existe una variabilidad elevada según las personas. Utilizando la técnica histoquímica por ATPasa, se ha visto, por un lado, que los sedentarios tienen un 45-55% de fibras tipo I, mientras que los deportistas de elite de ski de fondo o atletismo de fondo, con los consumos máximos de oxígeno ($VO_{2máx}$) más altos vistos en la literatura, pueden llegar a tener un 90% de fibras tipo I. Los halterófilos, jugadores de hockey hielo y sprinters suelen poseer un mayor porcentaje de fibras tipo II y unos valores de VO_{2max} mas bajos (Klausen et al. 1981). 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 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).

Recientemente, un estudio de Harber y col. (2002) , realizado en varones sedentarios, atletas de fondo y medio fondo y deportistas a nivel recreativo, demostró mediante la técnica de la electroforesis que los deportistas de fondo y medio fondo poseen un nivel de isoformas tipo I MHC mayor que el resto de los sujetos, y un menor porcentaje de isoformas tipo IIa, IIx. Asimismo, la técnica histoquímica por ATPasa reveló que los fondistas poseían un mayor porcentaje de fibras tipo I y de fibras tipo IIa que los medio fondistas.

Por otro lado, las fibras rápidas tipo II presentan una mayor facilidad para hipertrofiarse en respuesta al entrenamiento de fuerza que las fibras tipo I, además de producir una disminución de las fibras tipo IIx (Alway et al. 1989; Hather et al. 1991; Tarpinning et al. 2001). En este sentido, 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 MHC tipo IIx del músculo tríceps braquial, acompañado por un incremento de un 9.4% en la MHC tipo IIa (Gjovaag and Dahl 2008).

1.2.3 Biología del entrenamiento de fuerza.

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. También se han de tener en cuenta los principios fundamentales del entrenamiento de fuerza, puesto que se necesita un estímulo apropiado para poder modular las diferentes vías de transmisión de señales al interior celular que llevan en última instancia a la hipertrofia.

1.2.3.1 Mecanismos moleculares que producen hipertrofia tras un entrenamiento de fuerza.

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: (i) la activación del músculo; (ii) señalización procedente de deformación mecánica de las fibras musculares, hormonas y sistema inmune que responden frente al estímulo del entrenamiento de fuerza; (iii) síntesis proteica debida a una mayor transcripción y traducción; e (iv) hipertrofia de la fibra muscular.

(i) La activación del músculo: 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 pulsos 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: La influencia de realizar los ejercicios de forma explosiva (por ejemplo, levantamientos de pesas tipo olímpico), y la influencia de la fatiga muscular.

Acelerar la carga de una forma rápida aumenta la producción de fuerza (porque $\text{fuerza} = \text{masa} \times \text{aceleración}$) y por tanto, como se predice en el principio, recluta 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 mas pesada (67% de la fuerza isométrica máxima) a una velocidad mas lenta, la actividad electromiográfica (EMG) es mayor en el ejercicio de carga ligera (Linnamo et al. 2000).

Por otro lado, 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 a fatigarse. En este sentido, Izquierdo y col. (2009) 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 MHC tipo IIa 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 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 (rate of force development, en inglés) 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 II tienen una mayor capacidad para hipertrofiar tras un entrenamiento de fuerza que 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, el músculo gastrocnemio posee aproximadamente 60% de fibras tipo I y el músculo sóleo un 85% de fibras tipo I) (Trappe et al. 2001).

(ii) Señalización procedente de deformación mecánica de las fibras musculares: 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 proteína 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.

Señalización activada por la proteína quinasa B (Akt) y por la quinasa de proteína de mamíferos diana de la rapamicina (mTOR).

Cuando las fibras musculares se contraen, la señalización por Akt-mTOR aumenta de manera marcada y esta respuesta es crítica para incrementar la síntesis protéica en el músculo (Frost and Lang 2007; Hornberger et al. 2004), y su consiguiente crecimiento/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 la sarcómera se asocia con la fosfolipasa D y la inhibe. Sin embargo, como proponen Hornberger y col., 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 en la localización 4E del factor de iniciación eucariota (eIF) (4E-BP1) (Spiering et al. 2008).

A la par que mTOR, Akt también fosforila a la quinasa de la proteína glucógeno sintasa-3 β (GSK-3 β) y a la familia de factores de transcripción "*fork-head box O*" (FOXO). Akt fosforila e inhibe a GSK-3 β , la cual libera la inhibición de eIF2B. La inhibición de eIF2B resulta en la interacción methionyl-ARNm con la subunidad 40S para el inicio de la traducción. La fosforilación de FOXO mediada por Akt impide que la primera estimule la transcripción de ubiquitin-ligasas proteolíticas (Sartorelli and Fulco 2004).

Señalización de la proteína quinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK).

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 (Trebbak and Wojtaszewski 2008; Winder 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) durante situaciones de déficit energético (por ejemplo, el ejercicio) (Trebbak and Wojtaszewski 2008; Winder et al. 2006). 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; Trebbak and Wojtaszewski 2008). 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.

Señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK).

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 y mejorando la transcripción (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).

1.2.3.2 Respuestas hormonales del tejido muscular al entrenamiento de fuerza.

Existen factores endocrinos que influyen en 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, y estas respuestas vienen dadas principalmente por la hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento insulino dependiente 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 ha sido 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), y

también en personas que sufren el síndrome de Turner (Carel 2005). 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 a hombres jóvenes hipogonadales (Hayes et al. 2001) se ha visto un incremento del ARNm de IGF-1. En estudios que combinan el efecto de la GH y ejercicio físico, se ha observado una tendencia a incrementar la masa libre de grasa y las isoformas MHC (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 (*Janus Kinase 2*). JAK2 posee substratos “*downstream*” implicados en importantes funciones celulares (Pawlik-Pilipuk et al. 2002). Dentro de estos substratos cabe resaltar PI-3K (*Phosphatidylinositol-3 kinase*), 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 (Pawlik-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 eIF2B 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 insulino dependiente 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 influyen en la actividad biológica de IGF-1 (Nindl et al. 2001). En cuanto a las vías de señalización, IGF-1 estimula la hipertrofia muscular a través de PI-3K-Akt-mTOR (Frost and Lang 2007; 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). Existen numerosos estudios que demuestran que el entrenamiento de fuerza incrementa los niveles sistémicos de testosterona (Chandler et al. 1994; Kraemer et

al. 1990; Kraemer and Ratamess 2005). 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 transcripción 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 (Inoue et al. 1994). 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), y estimulan la proliferación y estimulación de estas células (Herbst and Bhasin 2004).

1.2.3.3 Actividad de las células satélite.

Las células musculares funcionan de una forma sincronizada, con varias células nucleadas que se funden para formar la fibra muscular. El factor desencadenante de este proceso son las 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 es 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 (Cramer et al. 2004), aunque este estímulo es insuficiente para inducir a la diferenciación final. Esta respuesta se acentúa durante el envejecimiento (Gallegly et al. 2004). 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 satélite locales (y sus núcleos asociados) a la fibra muscular existente.

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).

1.2.3.4 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. En un estudio de 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 eIF4E 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 es un índice de capacidad de traducción) 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.

1.2.3.5 Crecimiento del músculo

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. 2002). 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.

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 transversal de los grupos musculares entrenados (medido por resonancia magnética); y c) no existe evidencia de hiperplasia (McCall et al. 1996).

1.2.4 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. Las variables que se han de tener en cuenta a la hora de implementar un programa de entrenamiento de fuerza son las siguientes: (i) tipo y selección de los ejercicios; (ii) elección de las cargas; (iii) volumen (número de repeticiones x número de series x carga); (iv) descanso entre series y ejercicios; y (v) orden de los ejercicios.

(i) Tipo y selección de los ejercicios: 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 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 mucho 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 IIa tras un entrenamiento de fuerza de 14 semanas que consistía en ejercicios concéntricos que envolvían 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 (Eliasson et al. 2006), 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.

(ii) 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. 2002; 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 evaluar los efectos debidos a la carga de los efectos debidos al volumen del entrenamiento. Dependiendo de las cargas aplicadas varían las adaptaciones producidas. 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, 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) ($5 \times 10_{\text{Rel}}$) y relativa (%) ($5 \times 10_{\text{Abs}}$) las respuestas fueron superiores en términos de fatiga muscular (EMG), respuestas agudas hormonales (GH y FT) y de citoquinas (IL6, IL10) (Izquierdo 2009).

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.

La estimulación eléctrica de alta y baja intensidad (HFES y LFES respectivamente), es un recurso efectivo para estudiar el efecto de la carga del ejercicio sobre las respuestas en la señalización intracelular (Atherton et al. 2005; Nader and Esser 2001). La HFES estimula la señalización activada por Akt-mTOR, mientras que LFES aumenta la actividad AMPK. Estos resultados indican que, como es de esperar, las cargas altas promueven adaptaciones de crecimiento en el músculo (Borst et al. 2001), y cargas ligeras favorecen la resistencia muscular (puesto que la activación de AMPK promueve adaptaciones en resistencia) (Winder et al. 2006). Sin embargo, el volumen de ejercicio (número de repeticiones) y los periodos de descanso entre series y repeticiones fueron muy diferentes entre los protocolos HFES y LFES que se utilizaron en estas investigaciones (Atherton et al. 2005; Nader and Esser 2001). Por lo tanto, hasta la fecha no existen evidencias concluyentes en lo que se refiere a la influencia independiente de la carga del ejercicio en la señalización muscular.

El tipo de fibra muscular también puede influir en el efecto específico de la carga sobre las vías de señalización. En este sentido, se debe 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 S6K principalmente en fibras tipo II tras la contracción muscular (Parkington et al. 2003).

(iii) Volumen: 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 influyen las respuestas hormonales (Kraemer et al. 1990; Kraemer and Ratamess 2005), neuronales (Hakkinen et al. 1987) y metabólicas (Kraemer and Ratamess 2005) al ER. Gothsalk y col. (Gothsalk et al. 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 et al. 2001). 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. Por lo tanto, una mayor actividad AMPK podría estimular la resistencia muscular e inhibir la síntesis proteica (a través de la inhibición de la vía Akt-mTOR). Esta relación teórica entre entrenamiento de fuerza, volumen,

glucógeno muscular y señalización AMPK se sustenta en estudios que demuestran que si se reducen las reservas de glucógeno muscular, se potencia la actividad AMPK inducida por ejercicio (Churchley et al. 2007; Steinberg et al. 2006), y se atenúa la señalización Akt inducida por ejercicio (Creer et al. 2005).

Recientemente, McGee y col. (2008), demostraron que tras someter a los músculos plantares tanto en ratones salvajes (*wild type*) como en LKB1(-/-) a una sobrecarga durante 28 días, ambos logran el mismo grado de hipertrofia, además señalan a la isoforma $\alpha 1$ 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.

(iv) Periodos de descanso: Los periodos de descanso entre series y ejercicios influyen 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 (Pincivero et al. 2006). 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 promueve la hipertrofia muscular.

(v) Orden de los ejercicios: 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. 2002; Spreuwenberg et al. 2006). 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 RE 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. 2002). Una rutina de entrenamiento como ésta recluta una gran cantidad de tejido muscular, incluyendo unidades motoras tipo II, y estimula las mayores respuestas hormonales.

1.3 POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El receptor de andrógenos (AR), también conocido como NRC4 (subfamilia de receptores nucleares 3, grupo C, miembro 4), es un tipo de receptor nuclear transmembrana que se activa por su unión con las hormonas androgénicas como son la testosterona o la dihidrotestosterona (Roy et al. 1999). El AR está íntimamente relacionado con el receptor de progesterona, de hecho, dosis altas de progesterona pueden bloquear al AR (Raudrant and Rabe 2003). La función principal del receptor de andrógenos es actuar como un factor de transcripción de unión al ADN, el cual regula su expresión génica (Roy et al. 1999).

El gen del receptor de andrógenos, (AR) se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq 11-12) (Lubahn et al. 1988). Este gen consiste de 8 exones y codifica una proteína que posee 919 residuos de aminoácidos. El exon 1 de este gen posee dos motivos de repeticiones polimórficas (CAG y GGN), que codifican poliglutaminas y poliglicinas respectivamente, de longitudes variables en la región N-terminal (dominio de transactivación) de la proteína AR (Faber et al. 1989; Lubahn et al. 1988) (Figura 1). Las dos regiones de repeticiones están separadas por 248 aminoácidos de una secuencia no polimórfica. El AR comparte además con otros miembros de la familia de receptores nucleares una estructura y organización funcional que incluye un dominio N-terminal de transactivación (TAD), un dominio central de unión con el ADN (DBD), un dominio ligando C-terminal (LBD), y una región “bisagra” que conecta el LBD y el DBD (Rajender et al. 2007) (Figura 1). Diversos estudios han demostrado gran expresión de ARs en el tejido muscular esquelético (Bhasin et al. 2001; Sheffield-Moore 2000), siendo ésta aún mayor en respuesta a la sobrecarga muscular (Bamman et al. 2001).

En el caso de las mujeres, las células somáticas poseen dos cromosomas X, y en teoría, uno de ellos está inactivado en la mitad de las células, mientras que la otra mitad se encuentra activo. Este proceso de inactivación del cromosoma X ocurre en el desarrollo temprano y es aleatorio, por lo que normalmente tiene como resultado el desarrollo de tejidos con un número de células de origen paterno o materno aproximadamente similar (Buller et al. 1999).

La repetición CAG varía en longitud o número de repeticiones entre 8 y 35, siendo la media de 22, mientras que GGN, que es una repetición compleja que se representa como $(GGT)_3GGG(GGT)_2(GGC)_n$ oscila entre 10 y 30 repeticiones (Faber et al. 1989). La longitud de repeticiones del polimorfismo CAG y el potencial de transactivación de AR están inversamente correlacionados (Chamberlain et al. 1994; Kazemi-Esfarjani et al. 1995).

Estudios "*in vitro*", muestran que los alelos de AR con más de 40 repeticiones CAG poseen una actividad de transcripción reducida en comparación con las moléculas de 25, 20 y ninguna repetición (Chamberlain et al. 1994; Kazemi-Esfarjani et al. 1995). Por lo tanto, las evidencias sugieren que un mayor número de repeticiones CAG se asocian con una menor actividad AR, y por consiguiente, con las afecciones relacionadas con una menor actividad de los andrógenos. En humanos, un menor número de repeticiones de los polimorfismos CAG han sido relacionados con la cantidad de la masa libre de grasa en ancianos sanos (Walsh et al. 2005), así como hipertrofia benigna de la próstata, cáncer de próstata, infertilidad masculina (Giovannucci et al. 1997; Kukuvtitis et al. 2002; Mitsumori et al. 1999; Rodriguez-González G et al. 2008) y mayores concentraciones sistémicas de testosterona total y libre (Crabbe et al. 2007). Este polimorfismo ha sido también relacionado con cáncer de mama, endometrio y ovarios en mujeres (Gonzalez et al. 2007; Levine and Boyd 2001; Nicolas Diaz-Chico et al. 2007; Rodriguez et al. 2006; Yaron et al. 2001; Yu et al. 2000), así como con una menor BMD en postmenopáusicas que utilizan terapia de reemplazo hormonal (Retornaz et al. 2006). Sin embargo, no existen estudios que relacionen este polimorfismo con variables de condición física ni con la respuesta hipertrófica al entrenamiento de fuerza.

De forma similar, si se eliminan las repeticiones GGN, se obtiene como resultado una disminución del 30% en el potencial de transactivación (Gao et al. 1996). Esto se ha visto demostrado en cultivos celulares, donde los polimorfismos GGN que poseen un menor número de repeticiones poseen también un mayor contenido de la proteína AR, que por otro lado puede mejorar la respuesta a la estimulación por andrógenos (Ding et al. 2005). Sin embargo, no se ha determinado aún si este trinucleótido posee una función de proteína de interacción y si existe relación directa entre las repeticiones GGN y la función de transactivación del AR. Si esto ocurriera, la relación esperada se produciría entre un mayor número de repeticiones y disfunciones en la actividad androgénica, así como en el fenotipo muscular.

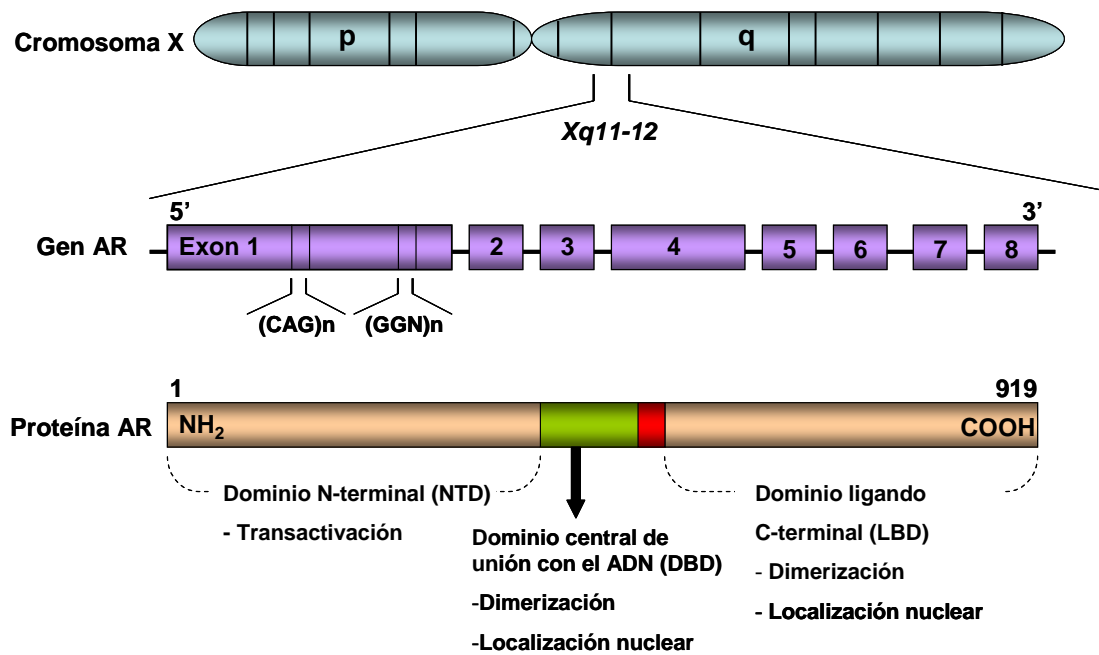


Figura 1. Organización genética del gen del receptor de andrógenos (AR) en el cromosoma X y principales dominios funcionales de la proteína codificada. Adaptado de Rajender y col. (2007).

1.3.1 Mecanismo de acción clásico o genómico del receptor de andrógenos.

El principal mecanismo de acción del receptor de andrógenos es la regulación directa de la transcripción génica. La testosterona libre atraviesa fácilmente la membrana celular porque es una hormona hidrofóbica. Entonces interacciona con el receptor de andrógenos que se encuentra en el citoplasma. Esto produce un cambio conformacional en el receptor y la activación del complejo testosterona libre-receptor, que se traslada al núcleo celular donde interacciona como un dímero con moduladores de transcripción y elementos de respuesta androgénica (una secuencia específica del ADN), localizados en la zona promotora de los genes diana. El complejo interacciona con otras proteínas en el núcleo que resultan en una regulación al alza o a la baja de la transcripción génica específica (Heemers and Tindall 2007) (Figura 2). La regulación al alza o activación de la transcripción produce a su vez un incremento en la síntesis del ARN mensajero, que sucesivamente es transcrito por los ribosomas para producir proteínas específicas (Heemers and Tindall 2007). Uno de los genes diana conocidos del AR es el IGF-1 (Pandini et al. 2005).

**RECEPTOR DE ANDRÓGENOS:
MECANISMO DE ACCIÓN CLÁSICO O GENÓMICO**

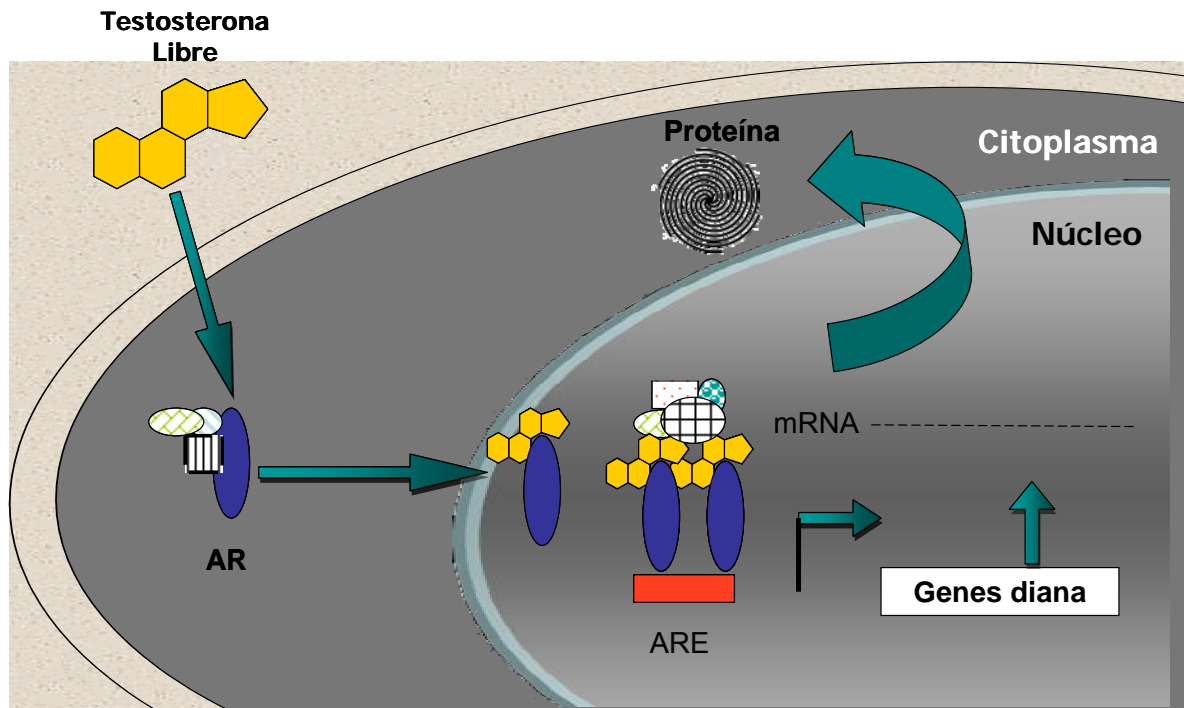


Figura 2. Mecanismo de acción clásico o genómico del receptor de andrógenos. ARE, elementos de respuesta androgénica. Adaptado de Heemers y col (2007).

1.4 HIPÓTESIS

- 1) La respuesta hipertrófica a un mismo entrenamiento de fuerza es superior en los hombres que en las mujeres.
- 2) La ganancia de masa muscular con el entrenamiento de fuerza se asocia a un aumento de la concentración sérica de testosterona libre y un descenso de la concentración de cortisol tanto en hombres como en mujeres.
- 3) El entrenamiento de fuerza produce una respuesta osteogénica más acusada en los hombres que en las mujeres.
- 4) Determinados polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a una mayor masa muscular en hombres y en mujeres.
- 5) Determinados polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a una mayor masa ósea y densidad mineral ósea en hombres y en mujeres.

1.5 OBJETIVOS

- 1) Determinar si realmente existe dimorfismo sexual en la respuesta hipertrófica muscular al ejercicio.
- 2) Determinar si existe un dimorfismo sexual en la respuesta osteogénica al ejercicio.
- 3) Determinar si ciertos polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a una mayor masa muscular en seres humanos adultos y físicamente activos.
- 4) Determinar si ciertos polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a una mayor masa ósea en seres humanos adultos y físicamente activos.

2. METODOLOGÍA (MATERIAL Y MÉTODOS).

2.1 SUJETOS.

Estudio II

Los sujetos analizados en este estudio se reclutaron a través de anuncios publicados en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria siendo todos estudiantes de la Licenciatura en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. En este estudio participaron 43 hombres (edad 23.9 ± 2.4 años, Talla 176.7 ± 7.1 cm, masa corporal 73.2 ± 10.1 kg; datos expresados en valores medios \pm SD) y 23 mujeres (edad 23.2 ± 2.7 años, talla 164.6 ± 6.3 cm, masa corporal 59.9 ± 5.8 kg; valores medios \pm SD). Todos los sujetos eran físicamente activos y estaban familiarizados con el entrenamiento de fuerza.

Estudios III y IV

En total 282 hombres (edad 28.3 ± 7.6 años, talla 176.5 ± 5.3 cm, masa corporal 77.5 ± 9.7 kg; valores medios \pm SD) y 61 mujeres (edad 24.4 ± 5.6 años, talla 176.5 ± 5.3 cm, masa corporal 59.9 ± 7.5 kg; valores medios \pm SD) sanos fueron reclutados entre el cuerpo de policía local de Las Palmas de Gran Canaria, estudiantes universitarios físicamente activos, y deportistas de clubes y centros deportivos.

Estudios II, III y IV

El estado de salud de cada participante se estableció mediante historia médica y examen físico. La historia deportiva fue establecida bajo el criterio de deportistas para los sujetos que practicaban actividad física de forma continuada al menos 3 horas por semana durante al menos el año previo al comienzo de este estudio y sedentarios para el resto de los sujetos que no cumplieran la mencionada condición. Aquellos sujetos que estuvieran tomando algún tipo de medicación, padeciendo algún tipo de enfermedad crónica, tendinosa o hipertensión fueron excluidos de los estudios. No hubo que excluir a ningún estudiante universitario, ni a ningún deportista. No obstante, fue necesario excluir a 18 policías.

2.2 MEDICIONES.

2.2.1 CONDICIÓN FÍSICA

Fuerza dinámica máxima (1RM)

La fuerza dinámica máxima fue medida usando el 1RM en los ejercicios de prensa inclinada (ILP), extensión de piernas (LE), media sentadilla (HS) y flexiones de piernas (LC). Los ejercicios de HS e ILP se realizaron con un equipamiento de levantamiento de pesas (Technogym Ltd, Barcelona, España); en un rango de movimiento comprendido entre la extensión total y un ángulo de rodillas de 90°. El rango de movimiento completo fue utilizado para el ejercicio de LE. En el caso de la LC, los sujetos levantaron la carga hasta el contacto con la parte posterior de los muslos. 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 los intentos. Con este procedimiento en cinco intentos como máximo se alcanzó el 1 RM.

Fuerza dinámica en el salto vertical y fuerza isométrica máxima de las extremidades inferiores.

Las fuerzas generadas durante el salto vertical se midieron mediante una plataforma de fuerza (Kistler, Winterthur, Suiza). Cada sujeto realizó dos tipos diferentes de saltos verticales máximos en los que se eliminó la contribución de los brazos:

1) Squat jump (SJ): Es un tipo de salto en el que hay que saltar desde una posición de salida con las piernas flexionadas por la rodilla a 90° y en el que no se puede realizar contramovimiento previo, un goniómetro digital (Lafayette Instrument Company, Lafayette, IN) fue utilizado para verificar la flexión de rodilla a 90° antes de realizar el SJ.

2) Salto con contramovimiento (CMJ): Es un tipo de salto en el que se parte de la posición de pie y se realiza un contramovimiento flexionando rápidamente las rodillas hasta unos 90° para conseguir impulso previo. A partir de los datos recogidos con la plataforma de fuerza se determinó la altura de vuelo (VJH), la fuerza máxima (Fp), siendo $F_p = \text{fuerza máxima} - \text{masa corporal}$, la potencia media (MP), el impulso mecánico positivo (PI) y la velocidad de desarrollo de fuerza (RFD) entre otras variables. Para ambos tipos de salto se empleó el mejor de tres intentos. La RFD media fue calculada a través de regresión lineal mediante la relación de la fuerza-tiempo durante la fase de impulso en el SJ y CMJ entre el 25 y 75% del pico de fuerza.

La fuerza isométrica máxima (FIM) desarrollada durante la extensión de piernas en posición de sentadilla a 90° también se midió con la misma plataforma de fuerza, siguiendo el protocolo descrito por Ara y col. (2004). Brevemente, a cada sujeto se le animó para que realizara lo más rápido posible la mayor fuerza que pudiera intentando mantenerla durante 5 segundos. Se guardaron los datos del mejor de tres intentos que se realizaron con al menos 1 minuto de recuperación entre ellos.

Capacidad anaeróbica.

Para estimar la capacidad anaeróbica se utilizó un test de carrera de 300 m. Este test fue elegido debido a que la capacidad anaeróbica es el principal determinante del rendimiento en esfuerzos máximos que llevan al agotamiento entre 30 y 60 s (Calbet et al. 1997; Calbet et al. 2003). El test se realizó en una pista de atletismo de 400 m y se midieron los tiempos mediante un cronómetro. A todos los sujetos se les pidió que corrieran los 300 m tan rápido como pudieran y los tests fueron efectuados individualmente, realizándose un solo intento.

Test de velocidad de carrera.

El tiempo invertido en correr 30m se midió utilizando células fotoeléctricas (General ASDE, Valencia). El cronómetro se activa de forma automática cuando el sujeto cruza la primera célula, y de ahí en adelante toma los tiempos cada 5 m. Se motivó a los sujetos para que corrieran todo lo rápido que pudieran, y se tomó como valor representativo de la prueba el mejor de tres intentos, separados por al menos por 1 minuto de descanso.

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. (1988). 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 $8.5 \text{ Km}\cdot\text{h}^{-1}$ aumentaba en $0.5 \text{ Km}\cdot\text{h}^{-1}$ cada minuto. El tiempo que los sujetos eran capaces de correr se registró para calcular el VO_{2max} . Este test ha mostrado una gran validez y reproducibilidad para la predicción del VO_{2max} (Leger et al. 1988).

2.2.2 COMPOSICIÓN CORPORAL

Antropometría.

Para la determinación de las medidas antropométricas se utilizó el protocolo “*O-Scale System*” (Ward et al. 1989). 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, Año Sayol, Barcelona, España), manteniendo la cabeza en el plano de Francfort. La masa corporal se midió mediante una báscula (Atlántida, Año Sayol, Barcelona, España) de 50g de precisión, calibrada a 50.0, 70.0 ó 90.0 Kg, mediante masas patrón de la clase M1. Todos los pliegues cutáneos se midieron mediante un plicómetro Holtain, que ejerce una presión constante de $10 \text{ g}\cdot\text{mm}^{-2}$ y tiene una precisión de 0.1 mm. Cada pliegue se determinó por triplicado, eligiendo el valor medio de las tres mediciones. Aquellas mediciones que se apartaron 2 o más desviaciones estándar de la media fueron descartadas y nuevamente repetidas. Las lecturas del grosor de los pliegues se efectuaron hacia el cuarto segundo de la aplicación del plicómetro, para reducir la variabilidad asociada a las diferencias de comprensibilidad cutánea.

Todos los perímetros fueron medidos 3 veces con una cinta métrica inextensible de 1 mm de precisión. Como valor correspondiente a cada perímetro se tomó la media de las 3 mediciones efectuadas. Cuando alguna se apartó 2 o más desviaciones estándar de la media, ésta fue descartada y repetida.

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). El equipo DXA se calibró según las especificaciones del fabricante, utilizando un fantoma de columna lumbar y fue operado en el modo de máxima resolución. 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 (cm^2) y el contenido mineral óseo (BMC) (g). La densidad mineral ósea superficial (BMD) se calculó siguiendo la fórmula $\text{BMD} = \text{BMC} \cdot \text{área total}^{-1}$. La masa magra de las extremidades (EE) permite estimar la masa muscular regional. También se realizaron exploraciones de la masa ósea de la columna lumbar (L1-L4) y de la región proximal del fémur izquierdo como se describe en Calbet y col. (2001) . Otras variables calculadas son el contenido y densidad mineral ósea del cuello femoral, el trocánter mayor, la zona intertrocanteriana y el triángulo de Ward, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La mayor ventaja de ésta técnica de análisis de la composición corporal reside en su validez y fiabilidad (Haarbo et al. 1991; López Calbet et al. 1996; Mazess et al. 1990; Van Loan and Mayclin 1992). Además, se considera que es la técnica más adecuada debido al tiempo tan corto de escaneado que necesita y a la baja irradiación, que supone de 20 a 50 veces menos que una radiografía de tórax (Lewis et al. 1986).

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, siguiendo la técnica de Bergstrom (1975), con la que se pueden obtener 40-60mg de músculo. Se obtuvieron biopsias en 48 de los sujetos antes y después del entrenamiento. La muestra de tejido muscular fue inmediatamente montada y embebida 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 fue llevado a cabo en las biopsias musculares usando electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida con SDS (SDS-PAGE, Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) como describe Larsson y col. (2002).

De cada biopsia se obtuvieron 20-40 secciones transversales ($10\ \mu\text{m}$) mediante corte con un criotomo a -20°C (LEICA, CM1850, Alemania) y fueron sumergidas en 200-500 μL de tampón de lisis laemnlly (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 10% Glycerol, 2.3% SDS, 5% Mercaptoethanol) y calentadas durante 3 minutos a 90°C . Entre 2 y 12 μL de esta suspensión fueron cargados en los geles de electroforesis (SDS-PAGE) y sometidos a 70 V durante 43 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).

2.2.3 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 los estudios III y IV, así como al comienzo y al final del experimento para el estudio II. 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 Immunoabsorbent Assay*). Esta técnica se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente (ELx800 Universal Microplate Reader, Bioteck Instruments). Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. Los kits empleados fueron los siguientes en función de la hormona que era objeto de análisis: Nordic Bioscience Diagnostics (Herlev, Denmark) para osteocalcina, Linco Research (St. Charles, Missouri, USA) para leptina, Diagnostic Systems Laboratories (Webster, Tex., USA) para cortisol y testosterona libre. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 6.7% y 6.7% para osteocalcina, 2.6% y 3.7% para leptina, 6.5% y 3.1% para testosterona libre, y 5.9% y 8.7% para cortisol, respectivamente.

Para la determinación de la concentración de 17 β -estradiol se utilizó la técnica ECLIA (electroquimioluminiscencia) utilizando reactivos E2 (Roche/Hitachi, 03000079122, Indianapolis, USA) y cuantificando la concentración mediante un analizador modular (Roche/Hitachi, Analytics analyzer E170, Indianapolis, USA). Los resultados se obtuvieron mediante una curva de calibración siendo la sensibilidad analítica 18.4 pmol/L.

Aislamiento de ADN sanguíneo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos.

El ADN fue aislado y purificado a partir de 200ul de sangre periférica usando el sistema High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Indianapolis, USA). Para la determinación de la longitud de las repeticiones de los tripletes CAG y GGN, las correspondientes regiones, localizadas en el exón 1 del gen del Receptor de Androgenos (GeneBank M27423) se amplificaron usando primers previamente descritos por otros grupos de investigación (Rodriguez et al. 2006).

Uno de los primers fue marcado con FAM o VIC. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l usando 50ng de ADN genómico, 200 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato, tampón para regiones ricas en GC al 1X (Roche, Indianapolis, USA), tampón de reacción de la polimerasa de ADN al 1X y 1U de Taq polimerasa (Fast Start, Roche). La concentración de cada par de primers fue de 1'2 μ M (para CAG) y 1'5 μ M (para GGN).

Las condiciones de la PCR fueron: 30 ciclos de 95°C durante 45seg, 56°C durante 30seg y 72°C durante 30seg para la amplificación de CAG. Para la amplificación de GGN se usaron 30ciclos de 95°C durante 1min, 55°C durante 2min y 72°C durante 2min. Cada PCR

fue iniciada con un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5min y terminada con un paso de expansión a 72°C durante 5min.

Los productos de PCR fueron diluidos a 1:100 con agua destilada y 1 µl de la dilución fue mezclado con 10 µl de formamida y 0.3 µl del standard de peso molecular (GeneScan 500LIZ Size Standard, Applied Biosystems). Tras desnaturalización a 98°C durante 5min la mezcla fue enfriada rápidamente en hielo previamente a la electroforesis capilar mediante el uso del secuenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y análisis de fragmentos mediante el Gene Scan Analysis Software (versión 3.7) (Applied Biosystem). La longitud exacta de los fragmentos fue corregida mediante un estándar de peso molecular de fabricación propia.

2.2.4 CONSENTIMIENTOS Y APROBACIÓN ÉTICA.

Previamente a la realización de las pruebas todos los sujetos analizados en los estudios II a IV 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.

2.2.5 ESTADÍSTICA.

Como estadísticos descriptivos se presentan los valores de la media y la desviación estándar (SD). La homogeneidad de las varianzas se estableció 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 II se establecieron mediante la prueba *ANOVA* para medidas repetidas, analizando también los cambios en función del tiempo, género 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.

Estudios III y IV: puesto que el gen del receptor de andrógenos está localizado en el cromosoma X y uno de los dos alelos está aleatoriamente inactivado en las mujeres (Lyon 1999), decidimos calcular la media de los dos alelos como una medida representativa de cada par en mujeres (Gonzalez et al. 2007; Jaaskelainen et al. 2008). La influencia de la longitud de las repeticiones del polimorfismo CAG y GGN en la composición corporal y variables de condición física fue determinada tomando los polimorfismos como variables continuas o dicotómicas mediante límites alélicos. El valor medio que mostró el mejor

balance entre los grupos de mujeres y hombres se usó como punto de corte, en consecuencia, los sujetos que tuvieran un número de repeticiones ≤ 21 en hombres y ≤ 22 en mujeres se clasificaron como CAG cortos (CAG_S), y aquellos sujetos que mostraran un número de repeticiones > 21 en hombres y > 22 en mujeres fueron clasificados como CAG largos (CAG_L). En el caso de GGN, aquellos sujetos que tuvieran un número de repeticiones ≤ 23 tanto en hombres como en mujeres fueron clasificados como GGN cortos (GGN_S), el resto de los sujetos fueron clasificados como GGN largos (GGN_L). Además, los sujetos fueron también clasificados según mostraran las siguientes combinaciones de haplotipos: CAG_S+CGN_L , CAG_L+CGN_S , CAG_L+CGN_L y CAG_S+CGN_S .

El análisis estadístico se realizó con el paquete informático SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se han asumido diferencias significativas para $P < 0.05$.

3. RESULTADOS.

3.1 Entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos en adultos: Diferencias según el género en las adaptaciones producidas sobre el eje grasa-hueso.

Análisis transversal.

Tomando en conjunto todos los sujetos de este estudio (grupo control y entrenamiento), se obtuvieron las siguientes relaciones directas e inversas:

La concentración basal de osteocalcina se correlacionó positivamente con el BMC del cuerpo entero ($r=0.31$; $P<0.05$) (Panel 1), la masa libre de grasa del cuerpo entero ($r=0.43$; $P<0.01$) (Panel 1), el BMC de las extremidades inferiores ($r=0.36$; $P<0.01$), la BMD de las extremidades inferiores ($r=0.29$; $P<0.05$), la masa libre de grasa de las extremidades inferiores ($r=0.42$; $P<0.01$) (Panel 1), el 1RM en el ejercicio de prensa inclinada ($r=0.27$; $P<0.05$), extensión de piernas ($r=0.27$; $P<0.05$), flexión de piernas ($r=0.35$; $P<0.01$) y la concentración sérica de testosterona libre ($r=0.41$; $P<0.01$) (Panel 2).

Por otro lado, la concentración de osteocalcina se correlacionó negativamente con la concentración sérica de leptina ($r=-0.37$; $P<0.01$) (Panel 2), cortisol ($r=-0.39$; $P<0.01$) (Panel 2), la masa grasa del cuerpo entero ($r=-0.31$; $P<0.05$) (Panel 1), el porcentaje de masa grasa del cuerpo entero ($r=-0.44$; $P<0.01$) (Panel 1), y el tiempo de carrera en el test de 30m ($r=-0.43$; $P<0.01$).

Además, la concentración sérica de leptina se correlacionó positivamente con el porcentaje de MHC tipo IIa en hombres ($r=0.36$; $P<0.05$, $n=31$).

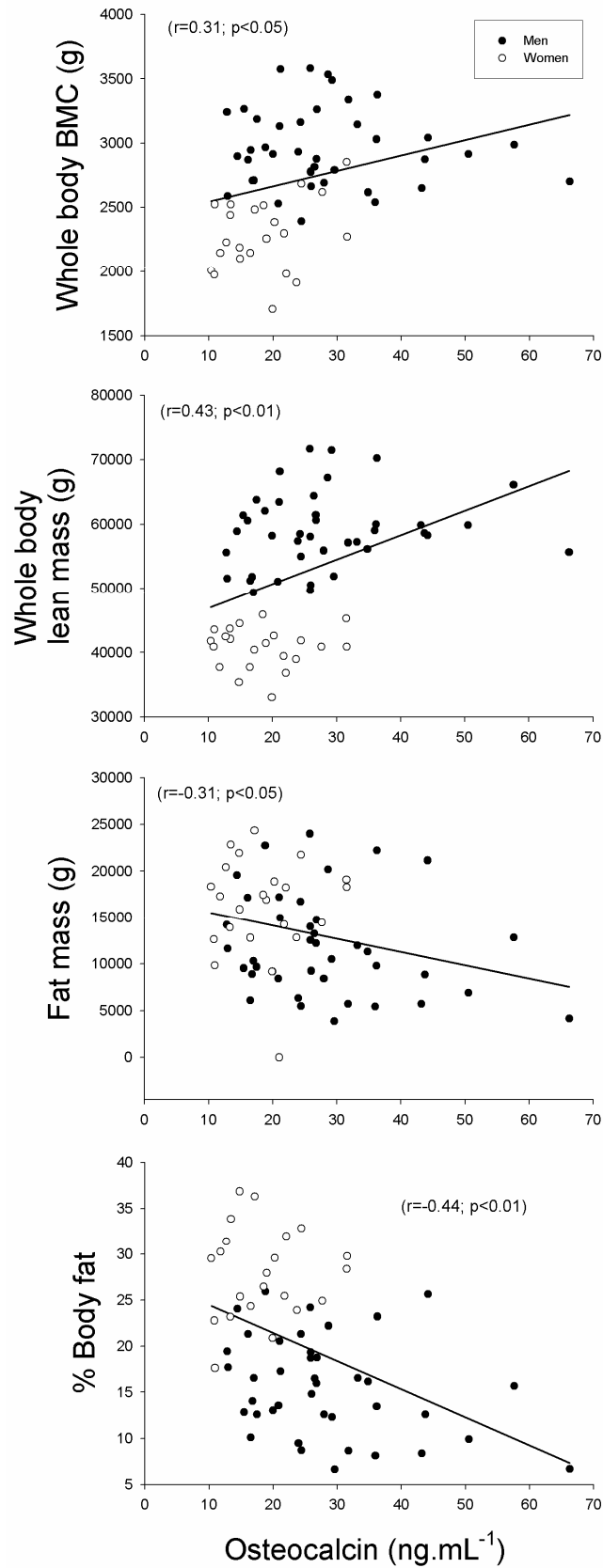


Figura 3 (Panel 1). Relación entre la concentración sérica de osteocalcina y BMC del cuerpo entero, masa libre de grasa, masa grasa y porcentaje de grasa corporal en 40 hombres (círculos negros) y 22 mujeres (círculos blancos).

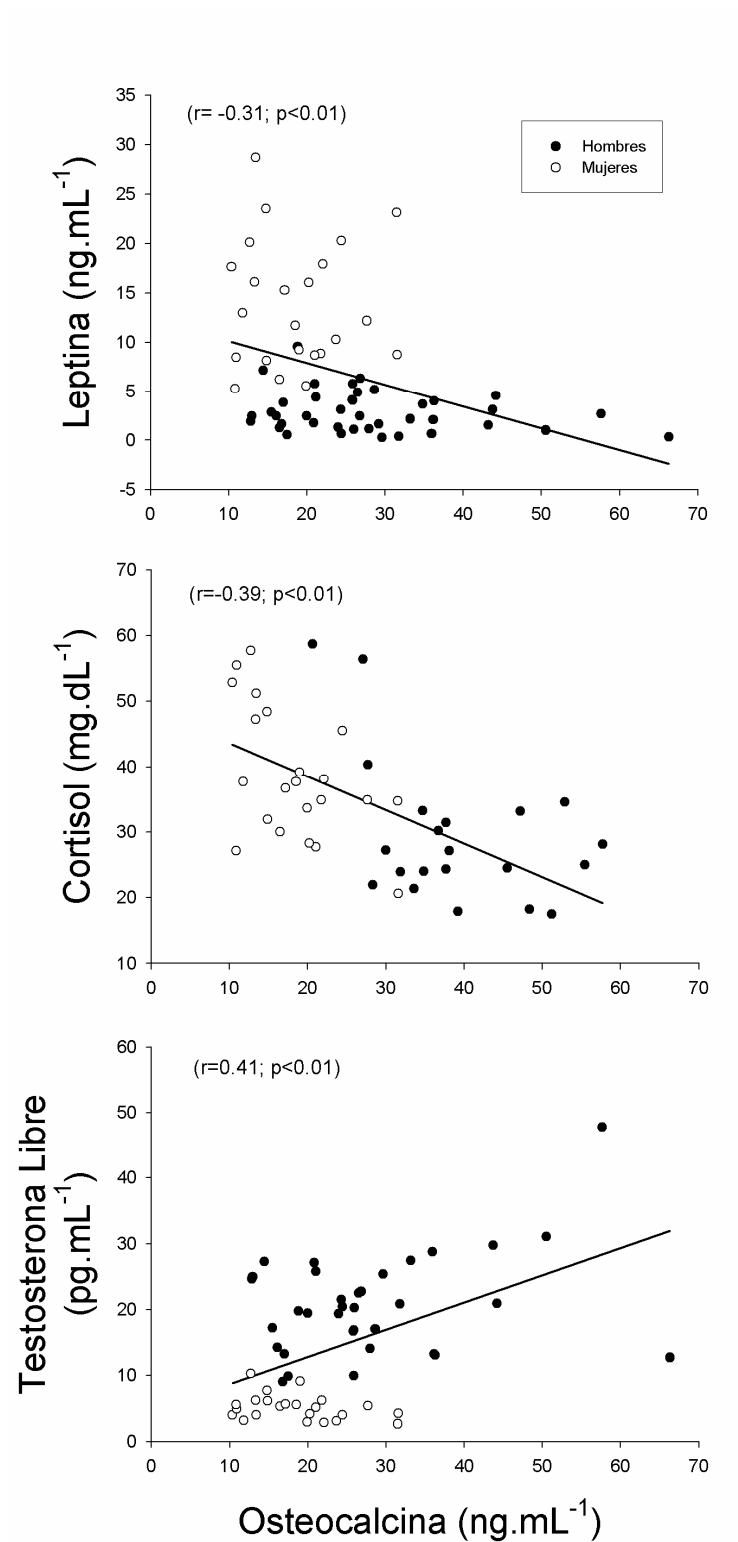


Figura 3 (Panel 2). Relación entre la concentración sérica de osteocalcina y las concentraciones séricas de leptina (n=63), cortisol (n=61), y testosterona libre (n=59) de la población estudiada. Los hombres se representan con círculos negros y las mujeres con círculos blancos.

Efectos del entrenamiento sobre la condición física.

En el grupo de entrenamiento, tanto en hombres como en mujeres, se obtuvieron mejoras significativas en el 1RM y FIM (Tabla 2, Figura 4). Además, se observó una variación alta en las mejoras de fuerza dinámica relativas según el ejercicio, oscilando éstas entre un 16 y 92%. Sin embargo, las mejoras fueron similares tanto en hombres como en mujeres (Figura 4). Se observó un dimorfismo sexual en la mejora de la FIM (+17.2% y +14% en hombres y mujeres, respectivamente, $P < 0.01$). Sin embargo, este dimorfismo fue no se observó cuando se analizó la FIM por kilogramo de masa muscular en las extremidades inferiores (+8.3% y +7.4% en hombres y mujeres respectivamente, $P < 0.01$; interacción ANOVA grupo x tiempo $P < 0.01$) (Figura 4).

Sólo las mujeres del grupo de entrenamiento mejoraron significativamente el tiempo en el test de velocidad de carrera de 30 m (interacción ANOVA tiempo x género $P < 0.05$, Tabla 2).

No se observó ningún cambio en los resultados del test de 300 m tras el periodo de entrenamiento (interacción ANOVA grupo x tiempo $P = 0.83$; interacción ANOVA género x grupo x tiempo $P = 0.97$, Tabla 2).

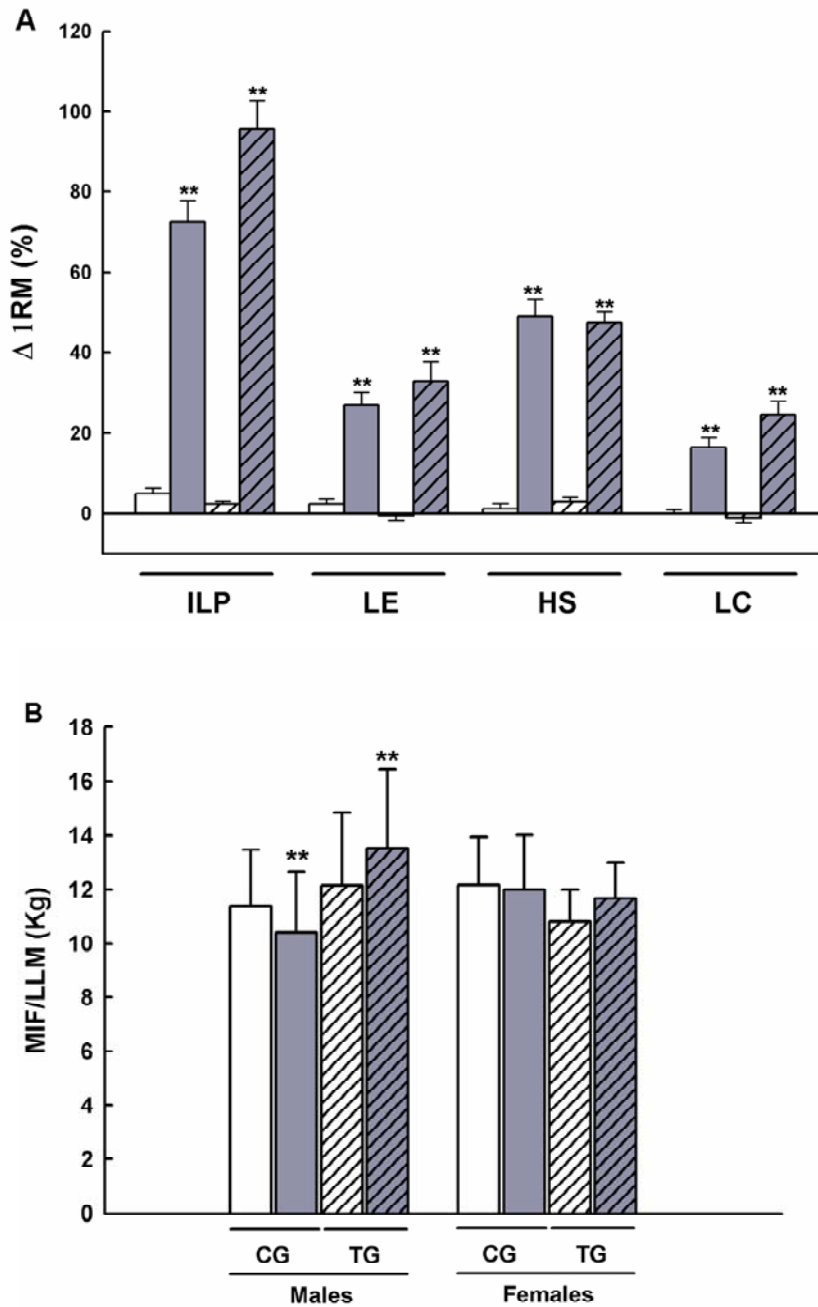


Figura 4. A. Efectos del entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliometricos en el 1RM. ILP, prensa inclinada de piernas; LE, extensión de piernas; HS, media sentadilla; LC, flexión de piernas; % Δ 1RM, incrementos relativos de repetición máxima expresados en porcentaje. Las barras blancas representan a los grupos control, las barras grises representan a los grupos entrenamiento, las barras rayadas representan a las mujeres, las barras enteras representan a los hombres. * $P < 0.01$ en la interacción grupo x tiempo.

B. Cambios en la fuerza isométrica máxima por kilogramo de masa libre de grasa de las extremidades inferiores (MIF/LLM) expresados en Kg x Kg de masa libre de grasa⁻¹, tras 9 semanas. CG, grupo control; TG, grupo entrenamiento; Valores expresados como media \pm SEM; * $P < 0.01$ antes vs. después del periodo de entrenamiento.

Tabla 2. Variables de condición física antes y después del entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos.

Test de condición física	Hombres						Mujeres						Interacción grupo x tiempo	Interacción grupo x tiempo x género
	Grupo control			Grupo entrenamiento			Grupo control			Grupo entrenamiento				
	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio		
ILP (kg)	253.9	265.9	4.7	211.8	360.3	70.1 **	155.9	160.0	2.6	119.4	228.7	91.5 **	p=0.001	p=0.08
SD	73.5	75.2		42.0	68.0		19.3	24.4		19.4	19.8			
LE (kg)	70.5	72.3	2.5	68.0	85.3	25.5 **	42.8	42.4	-0.9	47.5	62.3	31.1 **	p=0.001	p=0.85
SD	13.2	15.4		11.4	14.8		6.8	6.8		8.0	9.9			
HS (kg)	156.6	157.5	0.6	150.3	221.3	47.2 **	110.8	114.2	3.1	106.3	155.5	46.3 **	p=0.001	p=0.12
SD	36.6	34.2		28.5	39.0		18.3	20.0		17.7	19.6			
LC (kg)	58.4	58.5	0.2	55.4	64.0	15.5 **	32.8	32.3	-1.5	37.5	46.1	22.9 **	p=0.001	p=0.86
SD	10.0	10.4		8.2	8.4		6.3	6.4		5.3	4.4			
MIF (kg)	115.6	107.5	-7.0*	112.0	131.2	17.1 *	77.5	78.6	1.4	73.0	83.1	13.8 **	p=0.001	p=0.005
SD	23.8	23.7		20.4	26.7		12.2	16.5		8.7	8.7			
RMIF (kg)	1.52	1.41	-7.2**	1.61	1.85	14.9**	1.33	1.33	0.0	1.17	1.32	12.8**	P=0.001	p=0.03
SD	0.27	0.31		0.33	0.39		0.20	0.20		0.12	0.17			
MIF/LLM (kg)	11.40	10.41	-9.5**	12.15	13.53	11.36**	12.17	12.01	-1.31	10.8	11.67	8.1*	P=0.001	p=0.09
SD	2.06	2.23		2.71	2.92		1.79	2.19		1.2	1.32			
30m (s)	4.4	4.4	0.0	4.4	4.4	0.0	5.0	5.1	2.0 *	4.8	4.7	-2.1 *	p=0.02	p=0.034
SD	0.2	0.2		0.2	0.1		0.2	0.2		0.2	0.1			
300m (s)	47.0	47.2	0.4	46.3	46.4	0.2	59.6	59.2	-0.7	55.3	54.8	-0.9	p=0.84	p=0.97
SD	2.8	3.0		2.1	2.6		3.7	3.8		2.6	3.1			

Los valores son medias \pm desviación estándar. * P<0.05 en la comparación pre vs. post. ILP, prensa inclinada de piernas; LE, extensión de piernas; HS, media sentadilla; LC, flexión de piernas; MIF, fuerza isométrica máxima; RMIF, fuerza isométrica máxima por kilogramo de peso corporal; MIF/LLM, isométrica máxima por kilogramo de masa libre de grasa de las extremidades inferiores; 30m, test de velocidad de carrera en 30m; 300m, test de carrera de 300m.

Respuestas hormonales al entrenamiento.

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones hormonales medidas antes y después del periodo de entrenamiento, así como las interacciones entre los géneros y los grupos. Las mujeres muestran una mayor concentración en suero de cortisol, leptina y estradiol que los hombres. Por el contrario, se observó una mayor concentración de testosterona libre y osteocalcina en los hombres que en las mujeres (Tabla 3).

Las concentraciones séricas basales de testosterona libre, cortisol, 17β -estradiol y ratio testosterona libre/cortisol y no se vieron afectadas por el entrenamiento (interacción ANOVA grupo x tiempo $P=0.32$, $P=0.21$, $P=0.96$ y $P=0.22$ respectivamente, Tabla 3).

La concentración sérica de leptina se vio reducida con el entrenamiento (interacción ANOVA grupo x tiempo $P<0.05$, Tabla 3), pero sólo en las mujeres (interacción ANOVA género x tiempo en el grupo de entrenamiento $P=0.009$). Esta diferencia continuó siendo significativa tras realizar el análisis teniendo en cuenta el porcentaje de grasa corporal como covariable.

La concentración en sérica de osteocalcina aumentó tras el entrenamiento de fuerza en un 45% en los hombres y en un 27% en las mujeres (efecto del tiempo ANOVA $P<0.01$, Tabla 3), mientras que permaneció sin cambios en los sujetos control (interacción ANOVA grupo x tiempo $P<0.01$, Tabla 3). Sin embargo, las diferencias observadas en el incremento de la concentración de osteocalcina entre hombres y mujeres no fueron estadísticamente significativas (interacción ANOVA género x tiempo $P=0.15$, potencia estadística=0.30).

Tabla 3. Concentración basal sérica de hormonas antes y después del entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos.

	Hombres						Mujeres						Interacción grupo x tiempo	Interacción grupo x tiempo x género
	Grupo control			Grupo entrenamiento			Grupo control			Grupo entrenamiento				
	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio		
Testosterona libre (pg/mL)	21.1	19.6	-7.1	24.0	25.3	5.4	5.0	4.9	-2.0	5.4	5.8	7.4	p=0.32	p=0.51
	8.9	6.6		14.3	11.5		1.8	1.9		2.2	3.5			
Cortisol (mg/dL)	29.1	28.4	-2.4	33.0	31.0	-6.0	39.7	40.5	2.0	36.9	33.3	-9.7	p=0.21	p=0.49
	10.9	6.9		8.7	9.9		8.0	9.4		13.2	8.2			
FTCR	0.11	0.10	-9.1	0.11	0.12	9.1	0.02	0.02	0.0	0.02	0.02	0.0	p=0.22	p=0.29
	0.04	0.03		0.06	0.05		0.007	0.007		0.009	0.01			
Leptina (ng/mL)	3.0	2.9	-3.3	2.7	2.3	-4.8	13.7	15.5	13.1	13.6	11.7	-14.0	p=0.02	p=0.05
	2.5	2.0		1.4	1.1		6.8	7.7		6.1	6.0			
Estradiol (pg/mL)	21.5	21.3	-0.9	25.5	23.4	-8.2	62.47	49.06	-21.5	80.6	68.2	15.4	p=0.96	p=0.89
	16.2	15.5		15.8	11.8		66.53	41.28		57.6	82.0			
Osteocalcina (ng/ml)	31.9	31.5	-1.2	23.5	34.0	44.7**	17.7	18.8	6.2	20.3	25.8	27.1*	p=0.007	p=0.24
	14.0	11.5		7.1	11.4		4.4	7.1		8.9	11.0			

Concentraciones hormonales en suero antes y después del periodo de entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos. Los valores son medias \pm desviación estándar. FTCR, ratio testosterona libre-cortisol; * P<0.05 en la comparación pre vs. post. & P<0.05 en la comparación hombres-mujeres en el mismo corte temporal.

Efectos del entrenamiento sobre la masa grasa y masa muscular.

La masa grasa no se vio afectada significativamente por el entrenamiento ($P=0.99$). Sin embargo, la masa muscular libre de grasa aumentó en un 1.6% y en un 1.4% en hombres y mujeres del grupo de entrenamiento respectivamente (efecto ANOVA del tiempo $P<0.01$, Tabla 4), sin llegar a alcanzar la significación estadística en comparación con sus respectivos grupos control ($P=0.37$, Tabla 4). Tampoco se observaron efectos en función del género, grupo y tiempo ($P=0.50$, Tabla 4). El incremento en la masa libre de grasa con el entrenamiento se obtuvo principalmente en las extremidades inferiores, donde se produjo una ganancia de un 4.5% y un 5.3% en hombres y mujeres, respectivamente (Tabla 4). Del mismo modo, en el grupo control, la masa libre de grasa de las extremidades inferiores también aumentó significativamente en un 2.0% y un 2.8% en hombres y mujeres respectivamente (Tabla 4). Sin embargo, se produjo una interacción ANOVA en función del grupo ($P<0.03$, tabla 4), lo cual significa que las mejoras en masa libre de grasa fueron significativamente mayores en el grupo entrenamiento que en el grupo control.

Efectos del entrenamiento sobre la masa ósea.

El BMC del cuerpo entero (WBBMC) se vio incrementado con el entrenamiento en un 0.78% en el grupo de entrenamiento ($P>0.001$, Tabla 4), mientras que permaneció sin cambios en el grupo control (interacción ANOVA grupo x tiempo $P<0.05$, Tabla 4). Esta respuesta fue similar en hombres y mujeres (interacción ANOVA género x tiempo en el grupo entrenamiento $P=0.68$, Tabla 4). Por otro lado, la BMD del cuerpo entero se vio incrementada solamente en los hombres del grupo entrenamiento (desde 1.25 ± 0.07 a 1.26 ± 0.07 ; $\text{gr}\cdot\text{cm}^2$ $P<0.01$, Tabla 4), lo cual revela una interacción significativa en función del grupo y del género ($P<0.02$, Tabla 4).

El BMC de la columna lumbar (L1+L2+L3+L4), aumentó con el entrenamiento de forma similar en ambos sexos del grupo entrenamiento (2.0% y 1.2% en hombres y mujeres respectivamente, $P<0.01$, Tabla 4). Sin embargo, la interacción grupo x tiempo no alcanzó significación estadística ($P=0.21$, Tabla 4) y tampoco hubo un efecto significativo en función del género. Aunque los efectos generales en el BMD de la columna lumbar no fueron significativos, se observó una tendencia en la interacción grupo x tiempo en el grupo control ($P=0.07$, Tabla 4). Este efecto se debió al incremento en un 2.2% de la BMD lumbar observado en los hombres del grupo entrenamiento ($P<0.01$, Tabla 4).

No se observaron efectos significativos en el BMC ni en la BMD de las diversas regiones medidas de la cadera, exceptuando el BMC del cuello del fémur, el cual se vio aumentado con el entrenamiento (interacción grupo x tiempo $P<0.05$), sin diferencias significativas entre géneros (interacción género x tiempo en el grupo entrenamiento $P=0.31$, Tabla 4).

Tabla 4. Composición corporal antes y después del entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos.

Medición DXA	Hombres						Mujeres						Interacción grupo x tiempo	Interacción grupo x tiempo x género
	Grupo control			Grupo entrenamiento			Grupo control			Grupo entrenamiento				
	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio		
Cuerpo entero														
BMC (gr)	2986	2994	0.3	2903	2921	0.6**	2207	2208	0.0	2418	2441	1.0**	p=0.018	p=0.38
SD	327	317		269	266		269	280		267	271			
BMD (gr/cm ²)	1.24	1.24	0.0	1.25	1.26	0.8*	1.11	1.12	0.9*	1.15	1.15	0.0	p=0.97	p=0.017
SD	0.07	0.07		0.07	0.07		0.08	0.08		0.08	0.08			
LM (gr)	60669	61087	0.7	56397	57330	1.6**	40025	40552	1.3	42172	42774	1.4**	p=0.37	p=0.50
SD	5725.6	5683.4		5199.6	5751.8		3650.6	3706.8		1661.0	2420.8			
FM (gr)	12690.6	12827.3	1.1	10244.3	10334.4	0.9	16680.2	16200	-2.8	17240.3	16809.8	-2.5	p=0.99	p=0.89
SD	6572.1	6301.7		3330.7	2829.5		3900.2	3840.0		4656.0	4086.6			
FM (%)	15.8	16.0	1.2	14.5	14.5	0.0	28.0	27.2	-2.8	27.6	26.9	-2.5	p=0.97	p=0.75
SD	6.4	6.0		3.9	3.1		4.6	4.2		5.7	5.1			
Columna lumbar														
BMC (gr)	74.3	74.4	0.1	73.2	74.7	2.0*	59.2	59.6	0.7	67.4	68.2	1.2	p=0.21	p=0.49
SD	8.2	7.8		4.33	10.9		9.2	9.0		8.1	7.7			
BMD (gr/cm ²)	1.09	1.10	0.0	1.10	1.12	2.7**	1.05	1.05	0.0	1.12	1.12	0.0	p=0.25	p=0.13
SD	0.08	0.08	0.9	0.12	0.11		0.13	0.14		0.09	0.09			

Tabla 4. Composición corporal antes y después del entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos.

Medición DXA	Hombres						Mujeres						Interacción grupo x tiempo	Interacción grupo x tiempo x género
	Grupo control		Grupo entrenamiento			Grupo control		Grupo entrenamiento						
	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	% Cambio		
Extremidades inferiores														
BMC (gr)	639.8	644.4	0.7*	600.6	604.6	0.6*	436.0	436.2	0.0	488.6	491.2	0.5	p=0.66	p=0.50
SD	86.2	85.8		66.1	65.6		59.2	61.3		56.6	57.7			
BMD (gr/cm ²)	1.5	1.5	0.0	1.5	1.5	0.0	1.2	1.2	0.0	1.3	1.3	0.0	p=0.72	p=0.56
SD	0.1	0.1		0.1	0.1		0.1	0.1		0.1	0.1			
LM (gr)	10163.3	10374	2.1**	9307	9725	4.5**	6358	6547.4	2.9**	6715	7071	5.3**	p=0.03	p=0.94
SD	1166.3	1120.5		1094.8	1153.3		641.5	680.4		384.5	556.6			
Cadera														
BMC cuello del fémur	6.3	6.2	-1.6	6.3	6.3	0.0	4.8	4.7	-2.1	5.0	5.1	2.0*	p=0.05	p=0.31
SD	0.8	0.8		0.5	0.5		0.7	0.7		0.5	0.5			
BMD cuello del fémur	1.07	1.06	-1.0	1.08	1.06	-1.8	0.93	0.93	0.0	1.01	1.00	-1.0	p=0.07	p=0.19
SD	0.14	0.14		0.08	0.09		0.11	0.11		0.12	0.12			
Ward BMD	0.96	0.95	-1.0	0.91	0.91	0.0	0.86	0.85	-1.1	1.00	0.97	-3.0	p=0.58	p=0.35
SD	0.16	0.16		0.09	0.09		0.12	0.14		0.18	0.16			
BMD Trocánter	0.88	0.89	1.1	0.90	0.89	-1.1	0.78	0.78	0.0	0.81	0.81	0.0	p=0.13	p=0.54
SD	0.09	0.09		0.06	0.08		0.11	0.11		0.12	0.12			

Los valores son medias \pm desviación estándar. * $P < 0.05$ en la comparación pre vs. post. BMC, contenido mineral óseo; BMD, densidad mineral ósea; LM, masa muscular libre de grasa; FM, masa grasa.

Distribución de las cadenas pesadas de miosina (MHC)

Antes del periodo de entrenamiento, hombres y mujeres eran comparables en la distribución de MHC (Tabla 5). El entrenamiento de fuerza produjo un aumento en la proporción de MHC tipo IIa (+22%, efecto ANOVA del tiempo $P<0.01$) y una consiguiente disminución en la cantidad de MHC tipo I (-9.22%; efecto ANOVA del tiempo $P<0.02$) y MHC tipo IIx (-89% $P<0.05$) en los hombres. Sin embargo, no se observaron cambios significativos debidos al programa de entrenamiento de fuerza en las mujeres (Tabla 5, Figura 5), posiblemente debido a la insuficiente potencia estadística ($n=6$).

Tabla 5. Distribución de las isoformas de la cadena pesada de miosina en el músculo vasto lateral antes y después del entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos

MHC	Hombres						Mujeres						Interacción grupo x tiempo	Interacción grupo x tiempo x género
	Grupo control			Grupo entrenamiento			Grupo control			Grupo entrenamiento				
	Pre	Post	% Cambio	Pre	Post	%	Pre	Post	%	Pre	Post	%		
Tipo I	53.5	49.4	-7.6	57.2	51.9	-9.2**	58.8	56.1	-4.6	64.3	61.5	-4.3	p=0.83	p=0.86
SD	12.1	11.5		11.6	8.4		7.3	10.9		3.5	8.6			
Tipo IIa	40.3	45.8	13.6	39.0	47.6	21.3**	41.2	40.4	-1.9	33.6	36.2	7.7	p=0.33	p=0.98
SD	14.8	13.4		12.9	9.2		7.3	10.5		7.6	9.9			
Tipo IIx	5.7	5.2	-8.7	3.8	0.4	-89**	0.0	3.4		2.0	2.2	10	p=0.13	p=0.91
SD	9.5	10.6		6.4	0.9		0.0	8.1		5.0	5.4			

Composición y cambios de MHC en el músculo vasto lateral antes y después del entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos. Los valores son medias \pm desviación estándar. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ en la comparación pre vs. post.

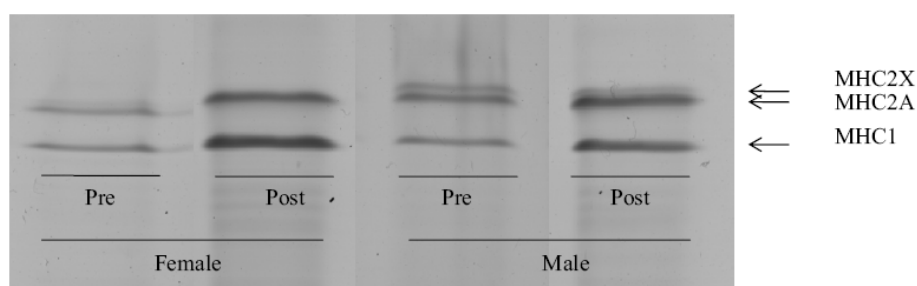


Figura 5. Identificación de las tres bandas correspondientes a las isoformas MHC I, IIa y IIx en biopsias musculares usando electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS (*Sodium Dodecylsulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*).

Se observó una correlación positiva entre el porcentaje de MHC tipo II al comienzo del programa de entrenamiento y el incremento en la concentración de osteocalcina con el entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos ($r=0.50$, $p<0.05$, $n=22$) (Figura 6).

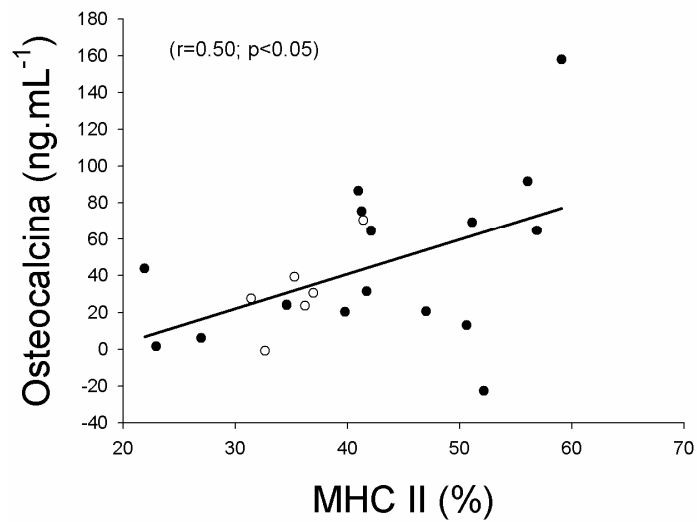


Figura 6. Relación entre el porcentaje de la isoforma de la cadena pesada de miosina tipo II (MHC II), en el músculo vasto lateral antes al inicio del entrenamiento de fuerza y el cambio en la concentración sérica de osteocalcina con el entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos en 16 hombres (círculos negros), y 6 mujeres (círculos blancos).

Relaciones entre los cambios en composición corporal, condición física y concentraciones hormonales.

En el grupo completo de sujetos, se observaron correlaciones significativas entre los cambios obtenidos en la concentración sérica de osteocalcina y los cambios obtenidos en la masa libre de grasa de las extremidades inferiores ($r=0.31$, $n=62$, $P<0.05$), y los cambios observados en el 1RM del ejercicio de media sentadilla ($r=0.27$, $n=59$, $P<0.05$).

En el grupo completo de mujeres (entrenamiento + control), los cambios en los niveles de osteocalcina correlacionaron con los cambios en la concentración sérica de testosterona libre ($r=0.57$, $n=23$, $P<0.05$), la masa libre de grasa del cuerpo entero ($r=0.48$, $n=22$, $P<0.05$), la masa libre de grasa de las extremidades inferiores ($r=0.42$, $n=22$, $P<0.05$), y el 1RM en el ejercicio de prensa inclinada ($r=0.46$, $n=20$, $P<0.05$).

Los cambios observados en la concentración sérica de leptina inducidos por el entrenamiento correlacionaron positivamente con los cambios en la masa grasa del cuerpo entero y con el porcentaje de grasa corporal ($r=0.49$ y 0.45 , respectivamente, $n=25$, ambos $P<0.05$), y negativamente con los cambios en la concentración sérica de cortisol ($r=-0.41$, $n=25$, $P<0.05$). La asociación entre los cambios en los niveles de leptina y masa grasa fue estadísticamente significativa en hombres ($r=0.47$, $n=18$, $P=0.05$), pero no en mujeres ($r=0.46$, $n=8$, $P=0.25$).

La ganancia de masa libre de grasa en las extremidades inferiores correlacionó positivamente con la ganancia de BMC en esta misma región ($r=0.45$, $n=27$, $P<0.05$).

En el grupo de entrenamiento, se observó una relación que tendió a ser positiva entre el cambio en la concentración de osteocalcina y los cambios observados en los niveles de leptina en hombres ($r=0.46$, $n=18$, $P=0.056$), mientras que esta asociación tendió a ser negativa en mujeres ($r=-0.57$, $n=8$, $P=0.14$).

3.2 Ciertos polimorfismos del gen del receptor de andrógenos influyen la masa muscular y la condición física en humanos.

Características de la población estudiada.

La composición corporal, valores antropométricos, nivel de actividad física y condición física por género de los sujetos incluidos en este estudio se muestra en la Tabla 6. Las frecuencias alélicas observadas para el número de repeticiones del polimorfismo CAG y GGN del AR se representan en las Figuras 7 y 8. En la población de mujeres estudiadas se observan 12 alelos CAG, oscilando el número de repeticiones desde 15 hasta 26, lo cual se corresponde con una distribución normal de la muestra. Los alelos más frecuentes entre las mujeres fueron los de $23>22>24$ repeticiones. En la población masculina se observaron 17 alelos, variando desde 13 a 35 repeticiones, con una distribución normal. Los alelos más

frecuentes en los hombres fueron los de 21>23>20 repeticiones. En cuanto al polimorfismo de longitud de repetición GGN, las mujeres mostraron 6 alelos, variando entre 19 y 25 repeticiones, siendo las mas frecuentes 23>24. En hombres, se observaron 14 alelos, variando entre 12 y 28 repeticiones. La repetición GGN no se distribuyó de forma normal ni hombres ni en mujeres.

Teniendo en cuenta esta distribución alélica, la población estudiada se dividió en los siguientes grupos:

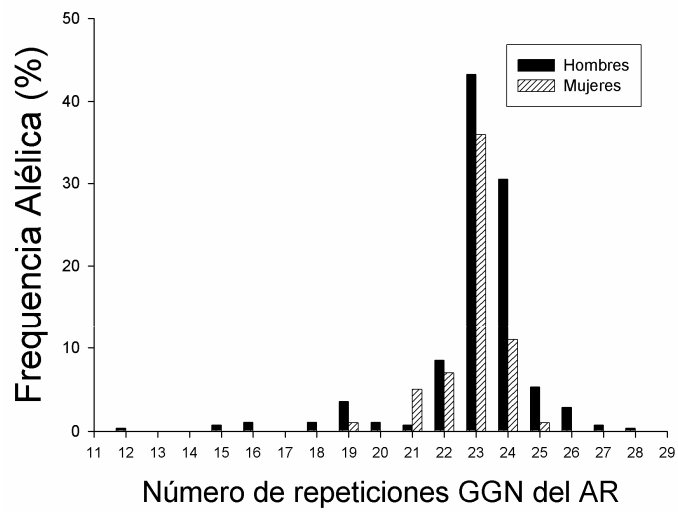
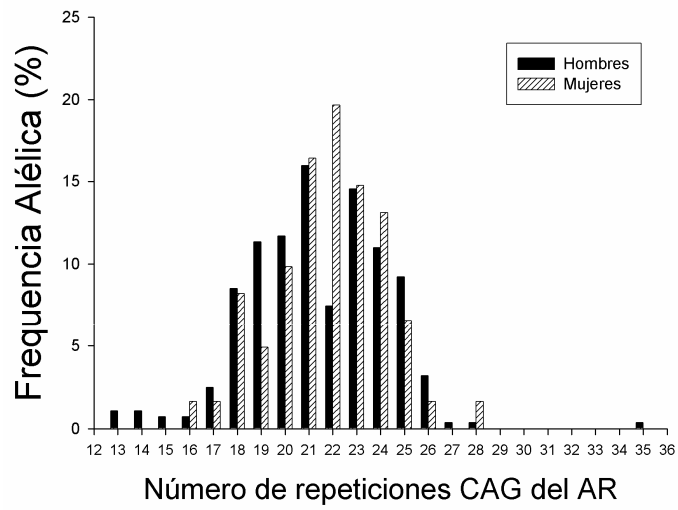
CAG corto (*short*) (CAG_s): aquellos sujetos con repeticiones CAG \leq 22 en mujeres y \leq 21 en hombres.

CAG largo (*long*) (CAG_L): si CAG $>$ 22 en mujeres y $>$ 21 en hombres.

GGN corto (*short*) (GGN_s): si los sujetos cumplían la condición de número de repeticiones GGN \leq 23 tanto en hombres como en mujeres.

GGN largo (*long*) (GGN_L): si GGN \geq 23 en ambos sexos.

Además, los sujetos fueron agrupados según las siguientes combinaciones de haplotipos: CAG_s+CGN_L, CAG_L+CGN_s, CAG_L+CGN_L and CAG_s+CGN_s.



Figuras 7 y 8. Histograma con la distribución del número de repeticiones CAG y GGN en hombres y mujeres.

Tabla 6. Composición corporal, valores antropométricos, actividad física y valores de condición física en hombres y mujeres con polimorfismos del receptor de andrógenos CAG_s y CAG_L.

	Hombres				Mujeres			
	CAG _s	n	CAG _L	n	CAG _s	n	CAG _L	n
Edad	28.3 ± 7.6	151	29.5 ± 7.6	131	24.4 ± 5.6	38	27.2 ± 8.1	22
Talla (cm)	176.5 ± 5.3	151	177.1 ± 5.8	131	164.2 ± 5.5 *	39	167.5 ± 5.9	22
Masa corporal (kg)	77.5 ± 9.7	151	78.8 ± 10.9	131	59.9 ± 7.5	39	62.0 ± 8.4	22
Porcentaje de grasa corporal (%)	19.3 ± 6.7	151	19.3 ± 8.0	131	27.0 ± 5.8	39	30.3 ± 8.1	22
Masa magra coporal (kg)	59.1 ± 5.8	151	60.0 ± 5.4	131	41.2 ± 3.7	39	40.4 ± 2.8	22
Masa magra brazos (kg)	6.6 ± 1.0	151	6.8 ± 0.9	131	3.6 ± 0.5	39	3.5 ± 0.4	22
Masa magra piernas (kg)	19.7 ± 2.3	151	19.8 ± 2.0	131	13.0 ± 1.5	39	12.8 ± 1.0	22
Masa magra extremidades (kg)	26.3 ± 3.1	151	26.6 ± 2.7	131	16.6 ± 1.9	39	16.3 ± 1.3	22
Masa magra brazos/Ht ² (kg.m ⁻²)	2.1 ± 0.3	151	2.2 ± 0.3	131	1.3 ± 0.2 *	39	1.2 ± 0.2	22
Masa magra piernas/Ht ² (kg.m ⁻²)	6.3 ± 0.6	151	6.3 ± 0.6	131	4.8 ± 0.5 *	39	4.6 ± 0.4	22
Masa magra extremidades/Ht ² (kg.m ⁻²)	8.4 ± 0.9	151	8.5 ± 0.8	131	6.2 ± 0.7 *	39	5.8 ± 0.5	22
Historia deportiva (años)	7.9 ± 6.3	145	8.1 ± 5.3	128	8.9 ± 9.6	37	4.8 ± 5.6	22

Tabla 6. Composición corporal, valores antropométricos, actividad física y valores de condición física en hombres y mujeres con polimorfismos del receptor de andrógenos CAG_S y CAG_L.

	Hombres				Mujeres			
	CAG _S	n	CAG _L	n	CAG _S	n	CAG _L	n
Tests de salto								
SJH (m)	0.30 ± 0.05	133	0.29 ± 0.05	118	0.23 ± 0.03	35	0.23 ± 0.05	21
SJWmax (w)	3387 ± 544	94	3429 ± 530	98	2262 ± 338	26	2215 ± 271	18
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	173.5 ± 18.7	94	172.1 ± 19.2	98	174.8 ± 19.1	26	173.9 ± 16.1	18
CMJJH (m)	0.34 ± 0.06	134	0.32 ± 0.06	118	0.27 ± 0.04	35	0.26 ± 0.05	21
CMJWmax (w)	3571 ± 595	96	3601 ± 519	98	2484 ± 342	26	2409 ± 330	18
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	180.9 ± 31.1	94	178.6 ± 25.1	98	192.0 ± 17.3	26	188.9 ± 18.3	18
Test de fuerza								
MVC (kg)	105.8 ± 22.0	126	107.0 ± 20.4	111	75.6 ± 12.9	27	67.8 ± 15.7	17
MVC/MML (kg.kg ⁻¹)	5.4 ± 1.0	126	5.4 ± 1.0	111	5.9 ± 0.9	25	5.3 ± 1.2	17
Test de carrera								
T30m (s)	4.51 ± 0.25	147	4.56 ± 0.33	125	5.05 ± 0.23	35	5.18 ± 0.35	19
T300m (s)	49.7 ± 7.1	148	50.7 ± 10.2	123	57.8 ± 4.9 *	38	62.4 ± 8.7	22
Potencia aeróbica máxima								
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	47.0 ± 7.9	142	47.7 ± 7.1	124	40.8 ± 6.6	35	42.6 ± 8.1	20

Los valores son medias ± desviación estándar. * $P < 0.05$ en la comparación con CAG_L (mismo género). Ht, altura; SJH, altura de saltos tipo squat; SJWmax, potencia máxima en saltos tipo squat; SJWmax/MML, potencia máxima en saltos tipo squat por kg de masa muscular en las extremidades inferiores (MML); CMJJH, altura de salto en saltos con contramovimiento; CMJWmax, potencia máxima en saltos con contramovimiento; CMJWmax/MML: potencia máxima en saltos con contramovimiento por kg de masa muscular en las extremidades inferiores; MVC, fuerza isométrica máxima en la posición squat; T30m and T300m, tiempo usado en completar 30 y 300 m respectivamente.

Influencia de los polimorfismos de repetición CAG sobre la masa muscular y la condición física.

La composición corporal, valores antropométricos, actividad física y condición física en los grupos CAG_S y CAG_L se muestran en la Tabla 6. Se observaron claras diferencias entre hombres y mujeres en gran parte de las variables.

El polimorfismo CAG no se asoció con ninguna de las variables estudiadas en los hombres. Tampoco se encontró ninguna diferencia significativa en la masa muscular libre de grasa o variables de condición física entre los grupos CAG_S y CAG_L en hombres.

En el grupo de las mujeres, se observó una correlación negativa entre el número de repeticiones CAG y la fuerza isométrica máxima normalizada por Kg de masa muscular de las extremidades inferiores ($r=-0.33$, $P=0.03$), y entre el número de repeticiones CAG y el VO_{2max} ($r=0.27$, $P=0.04$). Las mujeres del grupo CAG_L mostraron ser un 2% más altas que las mujeres del grupo CAG_S ($P<0.05$) (Tabla 6). La masa muscular libre de grasa en el cuerpo entero fue un 5.9% mayor en las mujeres con el polimorfismo CAG_S en comparación con las mujeres del grupo CAG_L (medias ajustadas por la altura²: 15.3 ± 1.2 vs 14.4 ± 1.1 kg · m², $P=0.009$). Esta diferencia se explica por un 6.1% más de masa muscular en las extremidades ajustada por la altura² en el grupo CAG_S ($P<0.05$), con un efecto similar en los brazos ($P<0.05$), y en las piernas ($P<0.05$) (Figura 9). La fuerza isométrica máxima por kilogramo de masa muscular en las extremidades inferiores tendió a ser superior (+10.6%, $P=0.08$) en las mujeres CAG_S, las cuales también corrieron el test de 300m un 6.7% más rápido ($P<0.05$) que las mujeres CAG_L (Figura 9).

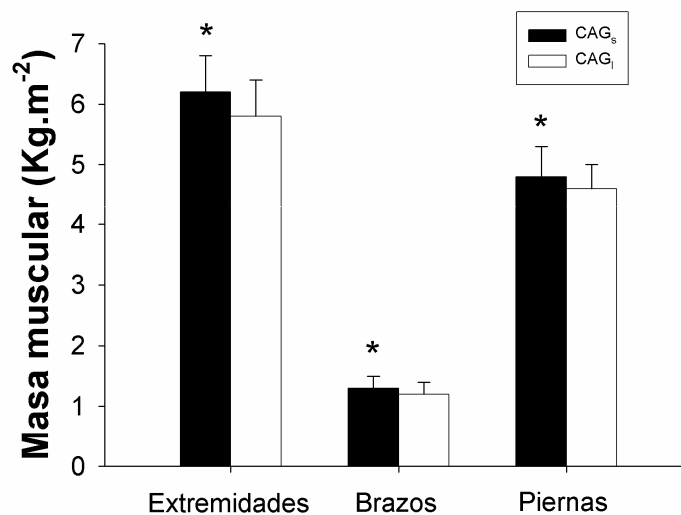


Figura 9. Polimorfismo de repeticiones CAG y masa muscular ajustada por la altura de las cuatro extremidades, brazos y piernas en las mujeres. Las barras negras representan el grupo con los polimorfismos cortos de CAG (CAG_s), y las barras blancas representan el grupo con los polimorfismos largos de CAG (CAG_L). * $P < 0.05$.

Influencia de los polimorfismos de repetición GGN sobre la masa muscular y la condición física.

La composición corporal, valores antropométricos, actividad física y condición física en los grupos GGN_s y GGN_L se muestran en la Tabla 7. Se observaron claras diferencias entre hombres y mujeres en gran parte de las variables.

En los hombres, se observa una tendencia a la significación en la correlación negativa entre el logaritmo del número de repeticiones GGN y la masa muscular de las extremidades (MME), expresada en Kg x altura² ($r = -0.11$, $P = 0.06$). Los hombres del grupo GGN_s también tendieron a tener una mayor fuerza isométrica máxima que los hombres GGN_L ($P = 0.11$) Tabla 7.

En las mujeres, se obtuvo una correlación inversa entre el logaritmo del número de repeticiones del polimorfismo GGN y la masa muscular de los brazos (MMA), expresado tanto en valor absoluto, como en Kg x altura², significando que el número de repeticiones GGN puede explicar un 7.7 y 8.8 % respectivamente, de la variabilidad en la masa muscular de los brazos en las mujeres. La relación entre el número de repeticiones del polimorfismo GGN y la masa muscular de los brazos fue similar tanto para el brazo dominante como para

el no dominante ($r=-0.25$ y $r=-0.27$, respectivamente, ambos $P<0.05$). La altura de vuelo en los saltos tipo squat y con contramovimiento también se correlacionó negativamente con el número de repeticiones del polimorfismo GGN ($r=-0.28$ y $r=-0.32$, ambos $P<0.05$), implicando que las repeticiones GGN pueden explicar un 7.6 y 10.4% respectivamente, de la variabilidad en la altura de salto de las mujeres.

Tabla 7. Composición corporal, valores antropométricos, actividad física y valores de condición física en hombres y mujeres con polimorfismos del receptor de andrógenos GGN_s y GGN_L.

	Men				Women			
	GGN _s	n	GGN _L	n	GGN _s	n	GGN _L	n
Edad	28.7 ± 7.1	170	29.1 ± 8.4	112	26.4 ± 7.5	31	24.5 ± 5.8	30
Talla (cm)	176.6 ± 5.5	170	177.1 ± 5.6	112	165.9 ± 6.2	31	164.8 ± 5.5	30
Masa corporal (kg)	77.5 ± 9.8	170	79.1 ± 10.9	112	60.6 ± 9.1	31	60.8 ± 6.5	30
Porcentaje de grasa corporal (%)	19.0 ± 6.9	170	19.7 ± 7.9	112	27.6 ± 8.4	31	28.8 ± 4.9	30
Masa magra coporal (kg)	59.4 ± 5.9	170	59.8 ± 5.2	112	41.0 ± 3.7	31	40.8 ± 3.1	30
Masa magra brazos (kg)	6.6 ± 1.0	170	6.7 ± 0.9	112	3.6 ± 0.5	31	3.5 ± 0.4	30
Masa magra piernas (kg)	19.7 ± 2.3	170	19.9 ± 2.1	112	12.9 ± 1.5	31	13.0 ± 1.2	30
Masa magra extremidades (kg)	26.3 ± 3.0	170	26.6 ± 2.8	112	16.5 ± 1.9	31	16.5 ± 1.6	30
Masa magra brazos/Ht ² (kg.m ⁻²)	2.1 ± 0.3	170	2.1 ± 0.3	112	1.3 ± 0.2	31	1.3 ± 0.1	30
Masa magra piernas/Ht ² (kg.m ⁻²)	6.3 ± 0.6	170	6.3 ± 0.6	112	4.7 ± 0.5	31	4.8 ± 0.5	30
Masa magra extremidades/Ht ² (kg.m ⁻²)	8.4 ± 0.8	170	8.5 ± 0.8	112	6.0 ± 0.7	31	6.1 ± 0.6	30
Historia deportiva (años)	7.8 ± 5.9	165	8.3 ± 5.8	108	7.1 ± 8.7	29	7.6 ± 8.4	30

Tabla 7. Composición corporal, valores antropométricos, actividad física y valores de condición física en hombres y mujeres con polimorfismos del receptor de andrógenos GGN_s y GGN_L.

	Men				Women			
	GGN _s	n	GGN _L	n	GGN _s	n	GGN _L	n
Tests de salto								
SJH (m)	0.29 ± 0.05	150	0.29 ± 0.06	101	0.23 ± 0.04	29	0.22 ± 0.04	27
SJWmax (w)	3394 ± 519	118	3432 ± 566	74	2238 ± 313	22	2248 ± 315	22
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	172.1 ± 18.8	118	174.0 ± 19.2	74	176.2 ± 18.8	22	172.7 ± 16.9	22
CMJH (m)	0.34 ± 0.06	151	0.32 ± 0.06	101	0.27 ± 0.05	29	0.26 ± 0.04	27
CMJWmax (w)	3594 ± 549	120	3574 ± 571	74	2445 ± 340	22	2462 ± 339	22
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	180.1 ± 26.9	118	179.0 ± 30.2	74	192.4 ± 18.2	22	189.0 ± 17.2	22
Test de fuerza								
MVC (kg)	107.6 ± 22.0	141	104.6 ± 20.1	96	73.0 ± 11.0	23	72.1 ± 17.6	21
MVC/MML (kg.kg ⁻¹)	5.5 ± 1.0	141	5.3 ± 1.0	96	5.8 ± 1.0	22	5.6 ± 1.1	20
Test de carrera								
T30m (s)	4.53 ± 0.27	162	4.54 ± 0.32	110	5.12 ± 0.32	28	5.07 ± 0.22	26
T300m (s)	49.7 ± 7.3	161	50.9 ± 10.3	110	60.7 ± 7.9	31	58.2 ± 5.4	29
Potencia aeróbica máxima								
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	47.6 ± 7.3	161	46.9 ± 7.8	105	41.4 ± 8.5	28	41.6 ± 5.7	27

Los valores son medias ± desviación estándar. * $P < 0.05$ en la comparación con CAG_L (mismo género). Ht, altura; SJH, altura de saltos tipo squat; SJWmax, potencia máxima en saltos tipo squat; SJWmax/MML, potencia máxima en saltos tipo squat por kg de masa muscular en las extremidades inferiores (MML); CMJH, altura de salto en saltos con contramovimiento; CMJWmax, potencia máxima en saltos con contramovimiento; CMJWmax/MML: potencia máxima en saltos con contramovimiento por kg de masa muscular en las extremidades inferiores; MVC, fuerza isométrica máxima en la posición squat; T30m and T300m, tiempo usado en completar 30 y 300 m respectivamente.

Efecto de las combinaciones de haplotipos: CAG_S+GGN_L , CAG_L+GGN_S , CAG_L+GGN_L y CAG_S+GGN_S .

La composición corporal, valores antropométricos, actividad física y condición física en las mujeres y hombres agrupados como CAG_S+GGN_L , CAG_L+GGN_S , CAG_L+GGN_L y CAG_S+GGN_S , se muestra en las tablas 8 y 9, respectivamente.

Los hombres que poseían la combinación CAG_S+GGN_S , saltaron un 9.0% mas alto ($P<0.05$) en los saltos CMJ que aquellos con la combinación CAG_L+GGN_L (Figura 10).

Las mujeres que poseían la combinación CAG_L+GGN_L tenían un 11.3 y 10.3% menos de masa muscular en los brazos ajustada por la altura² que aquellas que albergaban las combinaciones CAG_S+GGN_S así como CAG_S+GGN_L (ambas $P<0.05$). Además, las mujeres con la combinación CAG_S+GGN_S corrieron el test de 300m un 9% más rápido que las mujeres con la combinación CAG_L+GGN_S ($P<0.05$), y las mujeres con la combinación CAG_S+GGN_L corrieron el test de 30m un 12% mas rápido que las mujeres con la combinación de haplotipos CAG_L+GGN_S (Figura 11, Tablas 8 y 9).

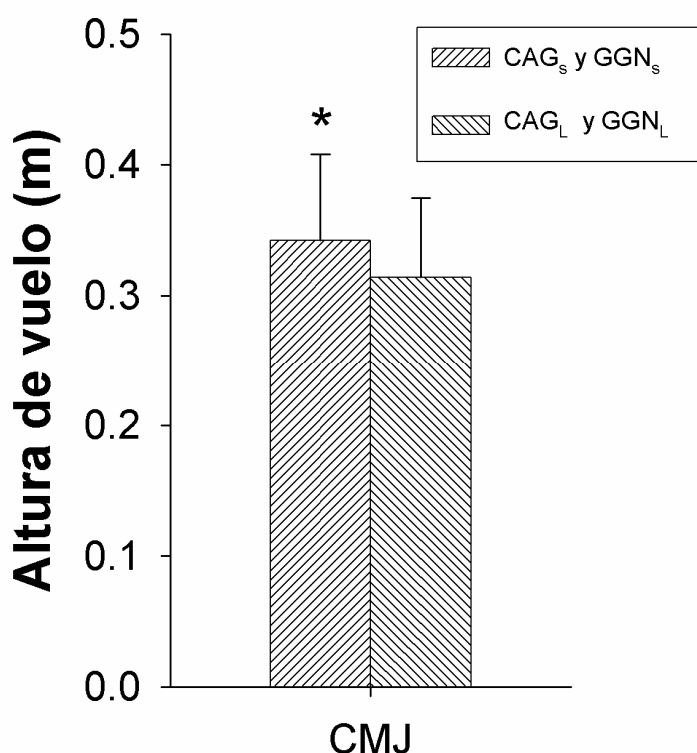


Figura 10. Altura de vuelo en hombres con la combinación de polimorfismos CAG cortos (CAG_S) y polimorfismos GGN cortos (GGN_S), comparados con aquellos que poseen la combinación de polimorfismos CAG largos (CAG_L) y polimorfismos GGN largos (GGN_L). * $P<0.05$.

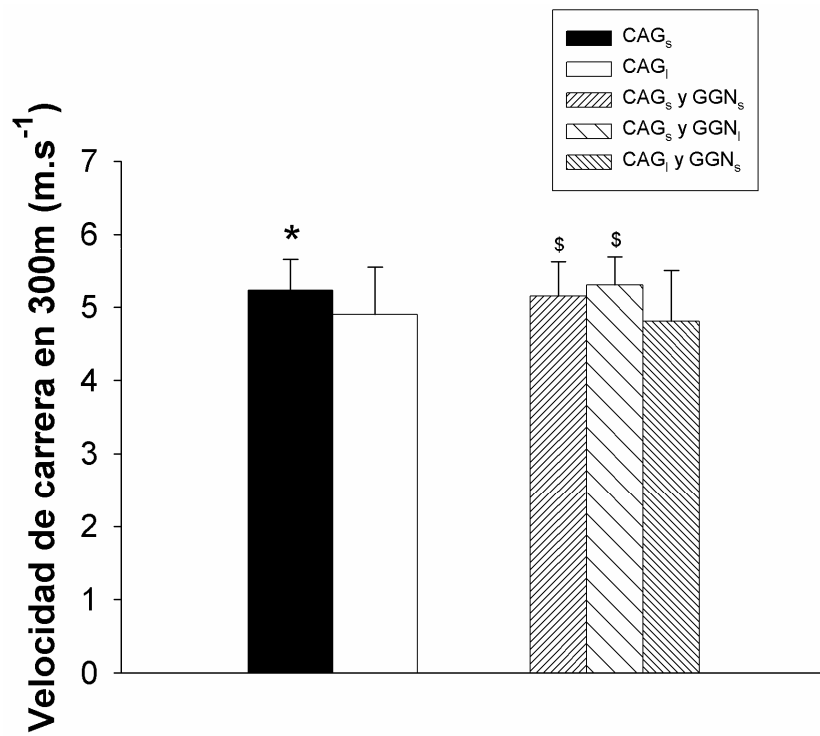


Figura 11. Polimorfismos del AR en mujeres y velocidad de carrera en el test de 300m.* $P < 0.05$, polimorfismos CAG cortos (CAG_s) comparados con los polimorfismos CAG largos (CAG_l); \$ $P < 0.05$, en la comparación con el grupo que posee la combinación CAG_l y el polimorfismo GGN largo (GGN_l). GGN_s: polimorfismo de repetición GGN corto.

Tabla 8. Composición corporal, valores antropométricos, nivel de actividad física y condición física en hombres con las combinaciones alélicas CAG_L+GGN_L, CAG_S+GGN_S, CAG_S+GGN_L, y CAG_L+GGN_S.

	CAG _L +GGN _L		n	CAG _S +GGN _S		n	CAG _S +GGN _L		n	CAG _L +GGN _S		n				
Edad	29.9	±	8.1	48	28.1	±	6.9	87	28.5	±	8.5	64	29.2	±	7.3	83
Talla (cm)	176.8	±	6.0	48	176.0	±	5.2	87	177.3	±	5.4	64	177.3	±	5.8	83
Masa corporal (kg)	80.0	±	12.8	48	76.9	±	9.9	87	78.3	±	9.4	64	78.2	±	9.7	83
Porcentaje de grasa corporal (%)	20.6	±	8.6	48	19.5	±	6.2	87	19.1	±	7.3	64	18.5	±	7.6	83
Masa magra coporal (kg)	59.6	±	5.3	48	58.5	±	6.2	87	59.9	±	5.2	64	60.3	±	5.5	83
Masa magra brazos (kg)	6.7	±	0.8	48	6.5	±	1.0	87	6.7	±	0.9	64	6.8	±	0.9	83
Masa magra piernas (kg)	19.6	±	2.0	48	19.5	±	2.4	87	20.1	±	2.2	64	19.9	±	2.1	83
Masa magra extremidades (kg)	26.3	±	2.7	48	25.9	±	3.3	87	26.8	±	2.9	64	26.7	±	2.7	83
Masa magra brazos/Ht ² (kg.m ⁻²)	2.1	±	0.3	48	2.1	±	0.3	87	2.1	±	0.3	64	2.2	±	0.3	83
Masa magra piernas/Ht ² (kg.m ⁻²)	6.3	±	0.6	48	6.3	±	0.7	87	6.4	±	0.6	64	6.3	±	0.6	83
Masa magra extremidades/Ht ² (kg.m ⁻²)	8.4	±	0.8	48	8.4	±	0.9	87	8.5	±	0.8	64	8.5	±	0.8	83
Historia deportiva (años)	9.2	±	5.5	47	8.1	±	6.6	84	7.6	±	6.0	61	7.5	±	5.2	81

Tabla 8. Composición corporal, valores antropométricos, nivel de actividad física y condición física en hombres con las combinaciones alélicas CAG_L+GGN_L, CAG_S+GGN_S, CAG_S+GGN_L, y CAG_L+GGN_S.

	CAG _L +GGN _L			CAG _S +GGN _S			CAG _S +GGN _L			CAG _L +GGN _S						
			n			n			n			n				
Tests de salto																
SJJH (m)	0.28	±	0.05	44	0.30	±	0.05	76	0.30	±	0.06	57	0.29	±	0.05	74
SJWmax (w)	3438	±	577	39	3365	±	537	59	3425	±	561	35	3423	±	502	59
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	175.4	±	20.3	39	174.1	±	19.2	59	172.6	±	18.1	35	170.0	±	18.3	59
CMJJH (m)	0.31	±	0.06 *	44	0.34	±	0.07	77	0.33	±	0.06	57	0.33	±	0.05	74
CMJWmax (w)	3560	±	577	39	3560	±	611	61	3591	±	573	35	3628	±	479	59
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	181.6	±	19.5	39	183.7	±	25.3	59	176.1	±	38.9	35	176.5	±	28.2	59
Test de fuerza																
MVC (kg)	103.9	±	20.9	44	106.3	±	23.7	74	105.3	±	19.5	52	109.1	±	20.0	67
MVC/MML (kg.kg ⁻¹)	5.3	±	1.1	44	5.5	±	1.1	74	5.2	±	0.9	52	5.5	±	0.9	67
Test de carrera																
T30m (s)	4.56	±	0.37	47	4.50	±	0.23	84	4.52	±	0.28	63	4.56	±	0.31	78
T300m (s)	51.9	±	12.5	47	49.4	±	6.1	85	50.2	±	8.3	63	50.0	±	8.5	76
Potencia aeróbica máxima																
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	46.7	±	8.3	44	46.9	±	8.2	81	47.1	±	7.6	61	48.3	±	6.3	80

Los valores son medias ± desviación estándar. * $P < 0.05$ en la comparación con CAG_L (mismo género). Ht, altura; SJJH, altura de saltos tipo squat; SJWmax, potencia máxima en saltos tipo squat; SJWmax/MML, potencia máxima en saltos tipo squat por kg de masa muscular en las extremidades inferiores (MML); CMJJH, altura de salto en saltos con contramovimiento; CMJWmax, potencia máxima en saltos con contramovimiento; CMJWmax/MML: potencia máxima en saltos con contramovimiento por kg de masa muscular en las extremidades inferiores; MVC, fuerza isométrica máxima en la posición squat; T30m and T300m, tiempo usado en completar 30 y 300 m respectivamente.

Tabla 9. Composición corporal, valores antropométricos, nivel de actividad física y condición física en mujeres con las combinaciones alélicas CAG_L+GGN_L, CAG_S+GGN_S, CAG_S+GGN_L y CAG_L+GGN_S.

	CAG _L +GGN _L			CAG _S +GGN _S			CAG _S +GGN _L			CAG _L +GGN _S		
		±	n		±	n		±	n		±	n
Edad	25.4	± 5.6	10	24.8	± 5.4	18	24.1	± 5.9	20	28.8	± 9.7	12
Talla (cm)	167.3	± 4.4	10	164.8	± 5.5	19	163.6	± 5.6	20	167.6	± 7.1	12
Masa corporal (kg)	61.5	± 5.3	10	59.4	± 8.1	19	60.4	± 7.1	20	62.5	± 10.5	12
Porcentaje de grasa corporal (%)	30.4	± 5.3	10	26.0	± 6.8	19	28.0	± 4.6	20	30.1	± 10.1	12
Masa magra coporal (kg)	40.3	± 2.1	10	41.3	± 4.0	19	41.0	± 3.5	20	40.5	± 3.3	12
Masa magra brazos (kg)	3.3	± 0.4	10	3.7	± 0.5	19	3.5	± 0.4	20	3.6	± 0.4	12
Masa magra piernas (kg)	12.8	± 0.7	10	12.9	± 1.7	19	13.1	± 1.4	20	12.8	± 1.3	12
Masa magra extremidades (kg)	16.1	± 1.0	10	16.6	± 2.1	19	16.7	± 1.8	20	16.4	± 1.5	12
Masa magra brazos/Ht ² (kg.m ⁻²)	1.2	± 0.2 *	10	1.3	± 0.2	19	1.3	± 0.1 \$	20	1.3	± 0.2	12
Masa magra piernas/Ht ² (kg.m ⁻²)	4.6	± 0.4	10	4.8	± 0.6	19	4.9	± 0.5	20	4.6	± 0.4	12
Masa magra extremidades/Ht ² (kg.m ⁻²)	5.8	± 0.5	10	6.1	± 0.7	19	6.2	± 0.6	20	5.9	± 0.6	12
Historia deportiva (años)	6.0	± 7.0	10	9.4	± 10.4	17	8.5	± 9.1	20	3.8	± 4.2	12

Tabla 9. Composición corporal, valores antropométricos, nivel de actividad física y condición física en mujeres con las combinaciones alélicas CAG_L+GGN_L, CAG_S+GGN_S, CAG_S+GGN_L, y CAG_L+GGN_S.

	CAG _L +GGN _L		n	CAG _S +GGN _S		n	CAG _S +GGN _L		n	CAG _L +GGN _S		n				
Tests de salto																
SJJH (m)	0.23	±	0.04	10	0.24	±	0.03	18	0.22	±	0.03	17	0.23	±	0.05	11
SJWmax (w)	2219	±	294	9	2256	±	352	13	2268	±	339	13	2212	±	265	9
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	174.6	±	16.8	9	178.4	±	20.7	13	171.3	±	17.5	13	173.2	±	16.4	9
CMJJH (m)	0.26	±	0.05	10	0.27	±	0.04	18	0.26	±	0.04	17	0.27	±	0.06	11
CMJWmax (w)	2336	±	313	9	2420	±	346	13	2549	±	340	13	2482	±	349	9
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	184.0	±	18.3	9	191.4	±	19.1	13	192.5	±	16.1	13	193.9	±	17.8	9
Test de fuerza																
MVC (kg)	66.0	±	17.7	8	75.4	±	7.6	14	75.9	±	17.2	13	69.4	±	14.6	9
MVC/MML (kg.kg ⁻¹)	5.2	±	1.2	8	6.0	±	0.7	13	5.9	±	1.1	12	5.5	±	1.3	9
Test de carrera																
T30m (s)	5.20	±	0.29	9	5.11	±	0.28	18	5.00	±	0.15	17	5.16	±	0.41	10
T300m (s)	60.6	±	7.0	10	58.7	±	5.6	19	56.9	±	3.9 &	19	63.8	±	10.0 *	12
Potencia aeróbica máxima																
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	41.6	±	4.0	10	40.2	±	6.8	18	41.5	±	6.6	17	43.6	±	11.0	10

Los valores son medias ± desviación estándar. * $P < 0.05$ en la comparación con CAG_L (mismo género). Ht, altura; SJJH, altura de saltos tipo squat; SJWmax, potencia máxima en saltos tipo squat; SJWmax/MML, potencia máxima en saltos tipo squat por kg de masa muscular en las extremidades inferiores (MML); CMJJH, altura de salto en saltos con contramovimiento; CMJWmax, potencia máxima en saltos con contramovimiento; CMJWmax/MML: potencia máxima en saltos con contramovimiento por kg de masa muscular en las extremidades inferiores; MVC, fuerza isométrica máxima en la posición squat; T30m and T300m, tiempo usado en completar 30 y 300 m respectivamente.

3.3 Testosterona libre, polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos y masa ósea en adultos jóvenes.

Características de la población estudiada.

Las características antropométricas y de composición corporal se muestran en la tabla 10 . Observamos 69 haplotipos diferentes en la población masculina y 30 en la femenina. La población femenina mostró estar en equilibrio *Hardy-Weinberg* ($P=0.45$), no ocurriendo así en la masculina ($P<0.001$). El número de repeticiones CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos no se correlacionaron ni en los hombres (correlación *Spearman* $=-0.05$, $P=0.43$), ni en las mujeres (correlación *Spearman* $=-0.03$, $P=0.79$), indicando el equilibrio en la unión entre los microsatélites CAG y GGN. Aquellos sujetos con el número de repeticiones igual o superior a la media de la población estudiada fueron considerados como CAG cortos (CAG_S) y GGN cortos (GGN_S) y viceversa, los sujetos que albergaron un número de repeticiones superior a la media fueron considerados como CAG largos (CAG_L). Por tanto las medias en las que se agrupó la población son las siguientes: CAG short (CAG_S), aquellos sujetos con repeticiones CAG ≤ 22 en mujeres y ≤ 21 en hombres; CAG long (CAG_L), si CAG > 22 en mujeres y > 21 en hombres. GGN short (GGN_S) si los sujetos cumplían la condición de número de repeticiones GGN ≤ 23 tanto en hombres como en mujeres; y GGN long (GGN_L) si GGN ≥ 23 en ambos sexos.

En la población masculina el test *Chi-square* fue significativo ($P=0.003$), indicando que estos cuatro grupos de haplotipos no estaban distribuidos normalmente, mostrando una mayor frecuencia de los haplotipos CAG_L y GGN_L. Las frecuencias observadas y las esperadas para los otros grupos de haplotipos no fueron significativamente diferentes.

En el grupo de las mujeres, las frecuencias observadas y las esperadas para los cuatro haplotipos no fueron significativamente diferentes, (*Chi-square* $P=0.18$). Además, ambas aproximaciones estadísticas indican que en el grupo de las mujeres no existió desequilibrio de unión y que esta población se encontraba en equilibrio *Hardy-Weinberg*.

Tabla 10. Composición corporal, valores antropométricos, e historia deportiva de la población estudiada.

	Hombres (n=282)		Mujeres (n=61)	
	Media	SD	Media	SD
Edad (años)	28.8	± 7.6 *	25.5	± 6.7
Talla (cm)	176.8	± 5.5 *	165.4	± 5.9
Peso corporal (Kg)	79.2	± 10.3 *	61.6	± 8.1
Porcentaje de grasa corporal	19.3	± 7.3 *	28.2	± 6.8
Masa magra total (Kg)	59.5	± 5.6 *	40.9	± 3.4
Masa magra total/Ht ² (Kg.m ⁻²)	19.0	± 1.5 *	15.0	± 1.2
Masa muscular de los brazos (Kg)	6.7	± 0.9 *	3.6	± 0.5
Masa muscular de las piernas (Kg)	19.8	± 2.2 *	12.9	± 1.4
Masa muscular de las extremidades (Kg)	26.4	± 2.9 *	16.5	± 1.7
Masa muscular de los brazos/ Ht ² (Kg.m ⁻²)	2.1	± 0.3 *	1.3	± 0.2
Masa muscular de las piernas/Ht ² (Kg.m ⁻²)	6.3	± 0.6 *	4.7	± 0.5
Masa muscular de las extremidades/Ht ² (Kg.m ⁻²)	8.4	± 0.8 *	6.0	± 0.6
Historia deportiva (años)	8.0	± 6.0	5.6	± 6.7

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (SD). Ht: Talla, * $P < 0.05$ hombres vs. mujeres.

Influencia del polimorfismo CAG del gen del receptor de andrógenos en la masa ósea.

Se observó una correlación negativa entre el logaritmo del número de repeticiones CAG y el BMC del cuello del fémur, el BMC del triángulo de Ward, y la BMD del triángulo de Ward en los hombres ($r_p = -0.12, -0.14$ and $-0.12, P < 0.05$). Los hombres y mujeres con un CAG largo poseían un 3.5 y 7% más BMC en la espina lumbar respectivamente comparadas con sus respectivos CAG_S ($P = 0.08$ y $P < 0.05$), para hombres y mujeres respectivamente. Sin embargo, este efecto desaparece cuando se tienen en cuenta las diferencias en altura.

En las otras regiones esqueléticas estudiadas, los hombres CAG_S mostraron valores similares en cuanto a BMC y BMD que aquellos del grupo CAG_L (Tabla 11). Mientras que las mujeres resultaron tener un BMC de las extremidades superiores un 8.8% mayor en el CAG_L comparado con el CAG_S ($P = 0.03$). Sin embargo, estas diferencias desaparecen cuando se tienen en cuenta las diferencias en altura entre los sujetos (Tabla 12).

Tabla 11. Polimorfismos de la repetición CAGs, CAG_L y masa ósea en hombres.

	CAGs (n=151)		CAG _L (n=131)		P
	Media	SD	Media	SD	
Edad (años)	28.3 ± 7.6		29.5 ± 7.6		0.18
Talla (cm)	176.5 ± 5.3		177.1 ± 5.8		0.38
Peso corporal (Kg)	77.5 ± 9.7		78.8 ± 10.9		0.27
BMC del cuerpo entero (g)	2985 ± 321		2998 ± 362		0.76
BMD del cuerpo entero (g.cm ⁻²)	1.24 ± 0.08		1.24 ± 0.09		0.93
BMC medio L ₂₋₄ (g)	18.4 ± 2.7		19.0 ± 3.4		0.08
BMD medio L ₂₋₄ (g.cm ⁻²)	1.1 ± 0.1		1.1 ± 0.1		0.28
BMC del cuello del fémur (g)	6.1 ± 0.9		6.0 ± 1.0		0.15
BMC intertrocantereo (g)	32.2 ± 5.2		31.9 ± 6.0		0.68
BMC trocánter mayor (g)	11.7 ± 2.2		11.6 ± 2.6		0.55
BMC triángulo de Ward (g)	1.00 ± 0.21		0.95 ± 0.21		0.07
BMD del cuello del fémur (g.cm ⁻²)	1.04 ± 0.13		1.02 ± 0.15		0.09
BMD intertrocantereo (g.cm ⁻²)	1.32 ± 0.15		1.31 ± 0.17		0.29
BMD trocánter mayor (g.cm ⁻²)	0.87 ± 0.11		0.85 ± 0.13		0.41
BMD triángulo de Ward (g.cm ⁻²)	0.89 ± 0.17		0.85 ± 0.17		0.05
BMC Extremidades superiores(g)	387 ± 56		395 ± 56		0.22
BMC Extremidades inferiores (g)	1266 ± 150		1247 ± 159		0.31
BMD Extremidades superiores (g.cm ⁻²)	0.83 ± 0.05		0.84 ± 0.05		0.38
BMD Extremidades inferiores (g.cm ⁻²)	1.48 ± 0.11		1.46 ± 0.12		0.15
Historia deportiva (años)	7.9 ± 6.3		8.1 ± 5.3		0.72

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (SD). BMC: contenido mineral óseo, BMD: densidad mineral ósea; L2-4: media de la segunda a la cuarta vértebra lumbar. Los sujetos fueron considerados como CAGs si poseían un número de repeticiones ≤21 y CAG_L si poseían un número de repeticiones >21.

Tabla 12. Polimorfismos de la repetición CAG y masa ósea en mujeres.

	CAG _S (n=39)		CAG _L (n=22)		P
	Media	SD	Media	SD	
Edad (años)	24.4 ±	5.6	27.2 ±	8.1	0.16
Talla (cm)	164.2 ±	5.5	167.5 ±	5.9	0.03
Peso corporal (Kg)	59.9 ±	7.5	62.0 ±	8.4	0.31
BMC del cuerpo entero (g)	2258 ±	258	2349 ±	276	0.20
BMD del cuerpo entero (g.cm ⁻²)	1.12 ±	0.08	1.13 ±	0.08	0.70
BMC medio L ₂₋₄ (g)	15.0 ±	2.1	16.1 ±	1.7	0.05
BMD medio L ₂₋₄ (g.cm ⁻²)	1.06 ±	0.11	1.09 ±	0.10	0.24
BMC del cuello del fémur (g)	4.7 ±	0.8	4.9 ±	0.8	0.39
BMC intertrocantereo (g)	20.9 ±	4.7	20.7 ±	2.8	0.86
BMC trocánter mayor (g)	8.0 ±	1.7	8.8 ±	2.1	0.15
BMC triángulo de Ward (g)	1.0 ±	0.2	1.0 ±	0.2	0.75
BMD del cuello del fémur (g.cm ⁻²)	0.95 ±	0.13	0.94 ±	0.13	0.87
BMD intertrocantereo (g.cm ⁻²)	1.16 ±	0.15	1.16 ±	0.13	0.29
BMD trocánter mayor (g.cm ⁻²)	0.77 ±	0.11	0.77 ±	0.12	0.98
BMD triángulo de Ward (g.cm ⁻²)	0.85 ±	0.15	0.85 ±	0.16	0.85
BMC Extremidades superiores(g)	258 ±	38	280 ±	40	0.03
BMC Extremidades inferiores (g)	897 ±	109	925 ±	118	0.36
BMD Extremidades superiores (g.cm ⁻²)	0.71 ±	0.05	0.73 ±	0.06	0.29
BMD Extremidades inferiores (g.cm ⁻²)	1.23 ±	0.09	1.22 ±	0.09	0.84
Historia deportiva (años)	8.9 ±	9.6	4.8 ±	5.6	0.08

Los valores se presentan como media ± desviación estándar (SD). BMC: contenido mineral óseo, BMD: densidad mineral ósea; L₂₋₄: media de la segunda a la cuarta vértebra lumbar. Los sujetos fueron considerados como CAG_S si poseían un número de repeticiones ≤22 y CAG_L si poseían un número de repeticiones >22.

Influencia del polimorfismo GGN del gen del receptor de andrógenos sobre la masa ósea.

No se observó ninguna asociación entre el número de repeticiones GGN y los valores regionales de BMC y BMD en hombres ni en mujeres.

Interacción entre los polimorfismos CAG y GGN en la influencia sobre la masa ósea en hombres.

El BMC y la BMD del cuerpo entero fueron similares en los cuatro haplotipos CAG-GGN estudiados (Figura 12). Aquellos hombres con la combinación CAG_L + GGN_L poseían un

6.3% más BMC que aquellos con el haplotipo CAG_S + GGN_S (Figura 12). Asimismo, los hombres con el haplotipo CAG_L + GGN_L poseían un 4.4 y 4.3% más BMD en la espina lumbar que aquellos que albergaban las combinaciones CAG_S + GGN_S y CAG_L + GGN_S, respectivamente (ambos $P < 0.05$). Figura 13.

Los hombres con la combinación CAG_S + GGN_S tenían un 13.8, 11.7 y 7.2% más BMC en el triángulo de Ward que aquellos con las combinaciones CAG_L + GGN_L, CAG_S + GGN_L, y CAG_L + GGN_S, respectivamente (todos $P < 0.05$) (Figura 14).

De la misma forma, la BMD del triángulo de Ward fue un 9.8, 7.9 y 6.9% mayor en hombres con la combinación CAG_S + GGN_S comparados con CAG_L + GGN_L, CAG_S + GGN_L, y CAG_L + GGN_S, respectivamente (todos, $P < 0.05$) (Figura 15).

La BMD del cuello del fémur fue un 4.8% superior en el grupo CAG_S + GGN_S comparado con el grupo CAG_L + GGN_S ($P < 0.05$) (Figura 15). La media de la BMD de las extremidades inferiores también resultó ser un 2.4% mayor en el grupo CAG_S + GGN_S comparado con el grupo CAG_L + GGN_S ($P < 0.05$) (Figura 16).

Interacción entre los polimorfismos CAG y GGN sobre la influencia en la masa ósea en mujeres.

El BMC y la BMD del cuerpo entero fueron similares en los cuatro haplotipos CAG-GGN estudiados (Figura 12). El BMC y la BMD de la espina lumbar fueron un 12.3 y 9.4% inferiores en el haplotipo CAG_S + GGN_S comparado con el haplotipo CAG_L + GGN_S (ambos $P < 0.05$) (Figura 13).

Las mujeres CAG_L + GGN_S poseían un 8.6% más de BMD en la columna lumbar que aquellas CAG_L + GGN_L ($P < 0.05$); asimismo, las mujeres CAG_S + GGN_L mostraron tener un 6.3% más BMD en la espina lumbar que las mujeres CAG_S + GGN_S (Figura 13).

El BMC del cuello del fémur fue un 15.2 y 13.6% mayor en el haplotipo CAG_L + GGN_S y CAG_S + GGN_L comparado con el haplotipo CAG_S + GGN_S ($P < 0.05$) (Figura 14).

El BMC del trocánter mayor fue un 22.7% mayor en el grupo CAG_L + GGN_S que en el grupo CAG_S + GGN_S ($P < 0.05$) (Figura 14).

La BMD del cuello del fémur resultó ser un 10.9 y un 9.1% mayor en el haplotipo CAG_S + GGN_L que en los haplotipos CAG_S + GGN_S y CAG_L + GGN_L, respectivamente (ambos $P < 0.05$) (Figura 15). La BMD intertrocanterica fue un 7.5% mayor en el haplotipo CAG_S + GGN_L que en el haplotipo CAG_S + GGN_S ($P = 0.05$) (Figura 15).

El BMC de las extremidades superiores fue un 15.0 y 11.3% mayor en el haplotipo CAG_L + GGN_S comparado con los haplotipos CAG_S + GGN_S y CAG_L + GGN_L, respectivamente (ambos $P < 0.05$).

La media de la BMD de las extremidades inferiores fue un 8.2 y 6.2% mayor en el haplotipo CAG_L + GGN_S que en los haplotipos CAG_L + GGN_L y CAG_S + GGN_S,

respectivamente ($P < 0.05$) (Figura 16). La media de la BMD de las extremidades inferiores también tendió a ser superior (+4.0%) en el haplotipo $CAG_S + GGN_L$ que en el haplotipo $CAG_S + GGN_S$ ($P = 0.08$) (Figura 16).

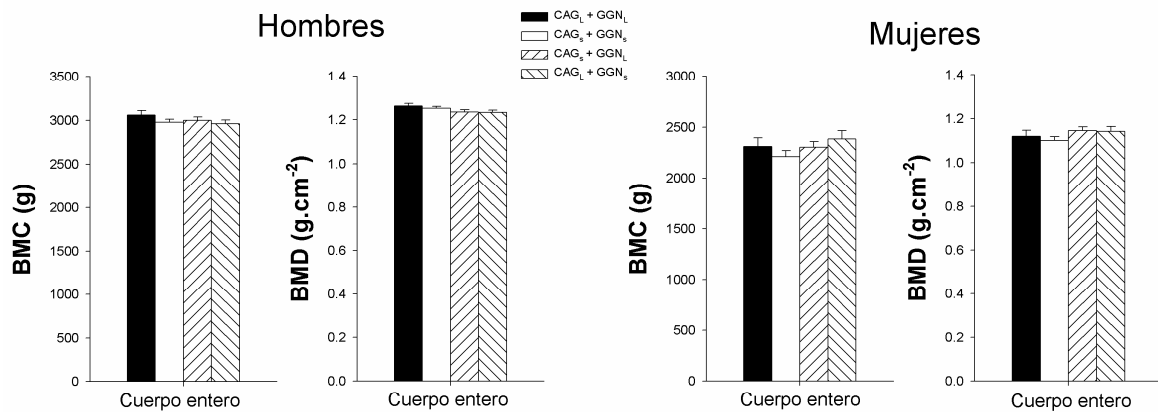


Figura 12. Contenido mineral óseo (BMC) y densidad mineral ósea (BMD) del cuerpo entero en hombres y mujeres. Los sujetos se agruparon como CAG_S si tenían un número de repeticiones ≤ 21 para los hombres y ≤ 22 para las mujeres, y CAG_L si tenían un número de repeticiones > 21 para los hombres y > 22 para las mujeres. El punto de corte para dividir los grupos para el polimorfismo GGN fue tener un número de repeticiones ≤ 23 tanto en hombres como en mujeres (GGN_S). Los sujetos que no cumplían esta condición fueron clasificados como GGN_L . Las cuatro combinaciones de haplotipos se definieron de la siguiente forma: $CAG_L + GGN_L$, $CAG_S + GGN_S$, $CAG_S + GGN_L$, y $CAG_L + GGN_S$.

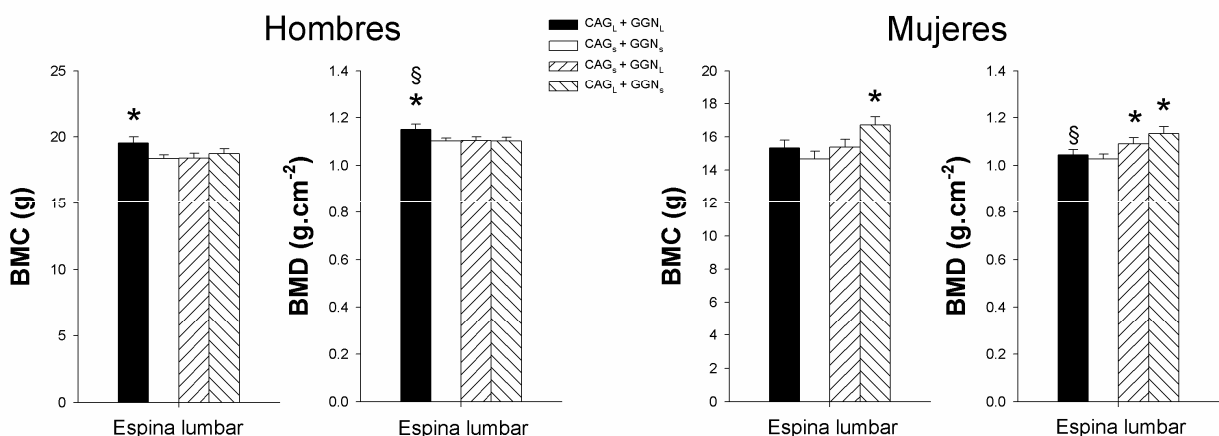


Figura 13. Contenido mineral óseo (BMC) medio (desde L₂, a L₄), y densidad mineral ósea media (BMD) en hombres y mujeres. Los sujetos se agruparon como CAG_S si tenían un número de repeticiones ≤ 21 para los hombres y ≤ 22 para las mujeres, y CAG_L si tenían un número de repeticiones > 21 para los hombres y > 22 para las mujeres. El punto de corte para dividir los grupos para el polimorfismo GGN fue tener un número de repeticiones ≤ 23 tanto en hombres como en mujeres (GGN_S). Los sujetos que no cumplían esta condición fueron clasificados como GGN_L . Las cuatro combinaciones de haplotipos se definieron de la siguiente forma: $CAG_L + GGN_L$, $CAG_S + GGN_S$, $CAG_S + GGN_L$, y $CAG_L + GGN_S$. * $P < 0.05$ comparado con la combinación $CAG_S + GGN_S$; § $P < 0.05$ en la comparación con la combinación $CAG_L + GGN_S$.

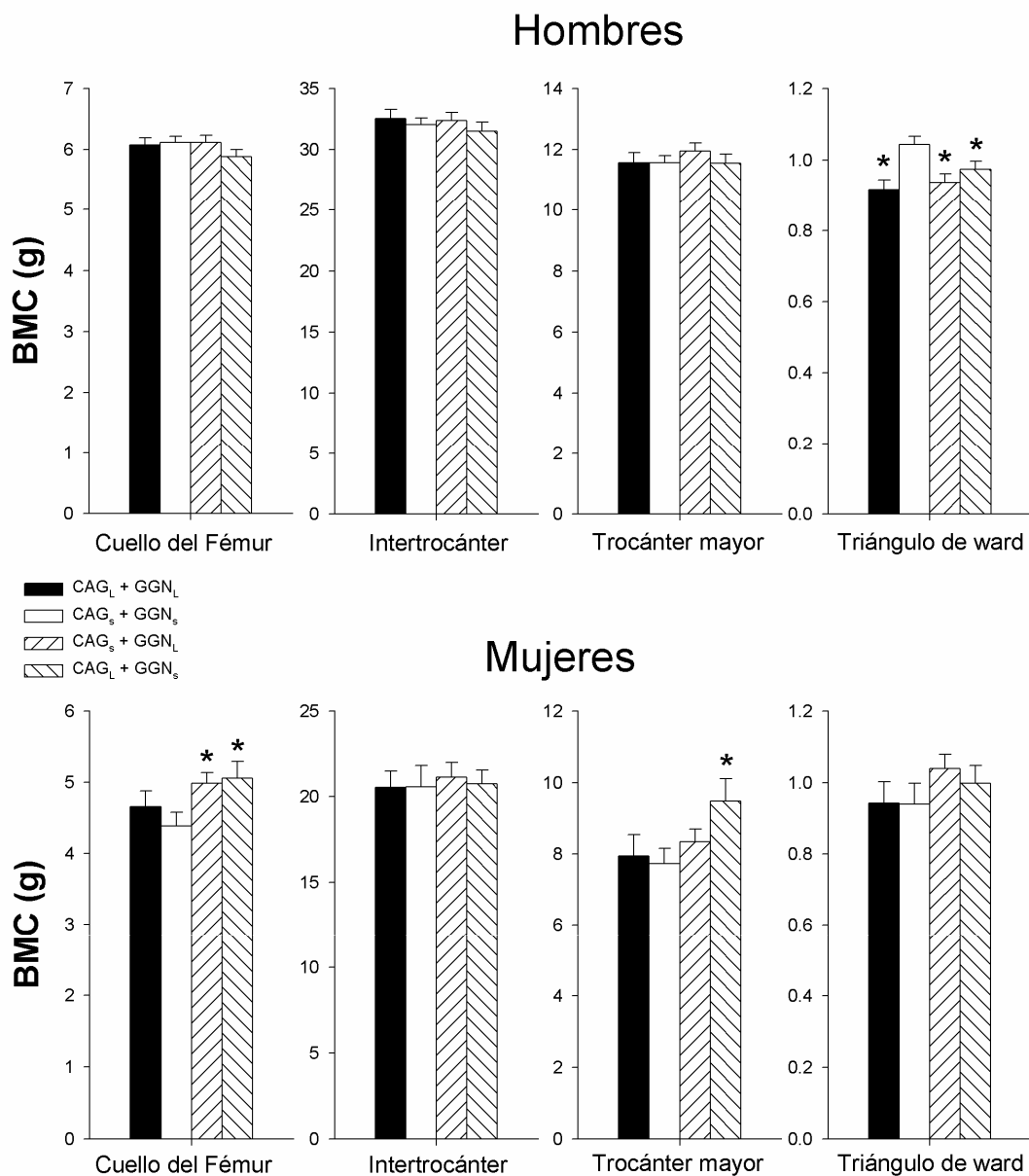


Figura 14. Contenido mineral óseo (BMC) de diferentes regiones de la cadera (cuello del fémur, región intertrocanterea, trocánter mayor y triángulo de *Ward*) en hombres y mujeres. Los sujetos se agruparon como CAG_S si tenían un número de repeticiones ≤ 21 para los hombres y ≤ 22 para las mujeres, y CAG_L si tenían un número de repeticiones > 21 para los hombres y > 22 para las mujeres. El punto de corte para dividir los grupos para el polimorfismo GGN fue tener un número de repeticiones ≤ 23 tanto en hombres como en mujeres (GGN_S). Los sujetos que no cumplían esta condición fueron clasificados como GGN_L. Las cuatro combinaciones de haplotipos se definieron de la siguiente forma: CAG_L + GGN_L, CAG_S + GGN_S, CAG_S + GGN_L, y CAG_L + GGN_S. * $P < 0.05$ comparado con la combinación CAG_S + GGN_S.

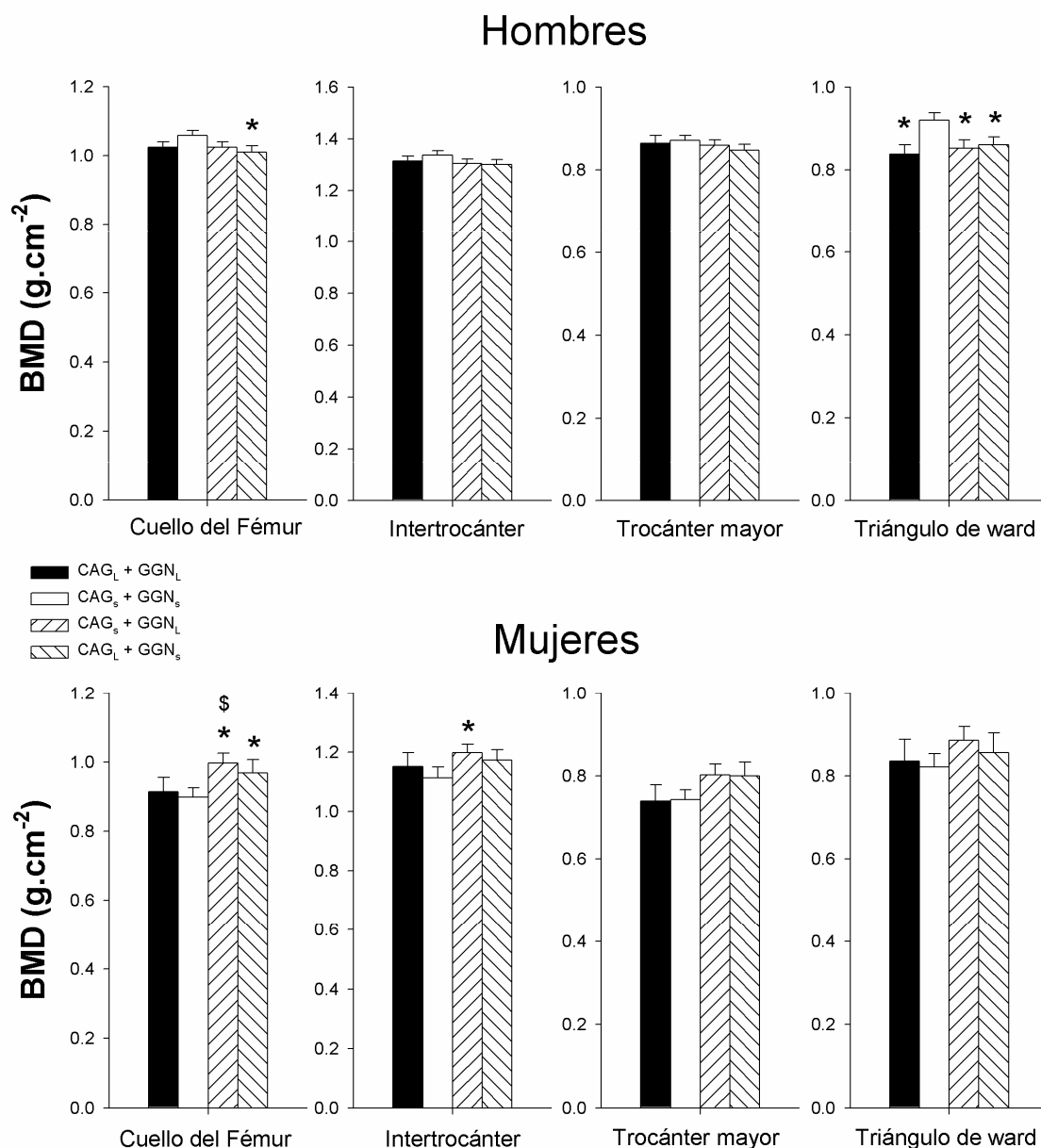


Figura 15. Densidad mineral ósea (BMD), de diferentes regiones de la cadera (cuello del fémur, región intertrocanterea, trocánter mayor y triángulo de *Ward*) en hombres y mujeres. Los sujetos se agruparon como CAG_S si tenían un número de repeticiones ≤ 21 para los hombres y ≤ 22 para las mujeres, y CAG_L si tenían un número de repeticiones > 21 para los hombres y > 22 para las mujeres. El punto de corte para dividir los grupos para el polimorfismo GGN fue tener un número de repeticiones ≤ 23 tanto en hombres como en mujeres (GGN_S). Los sujetos que no cumplían esta condición fueron clasificados como GGN_L. Las cuatro combinaciones de haplotipos se definieron de la siguiente forma: CAG_L + GGN_L, CAG_S + GGN_S, CAG_S + GGN_L, y CAG_L + GGN_S. * $P < 0.05$ comparado con la combinación CAG_S + GGN_S. § $P < 0.05$ en la comparación con la combinación CAG_L + GGN_S.

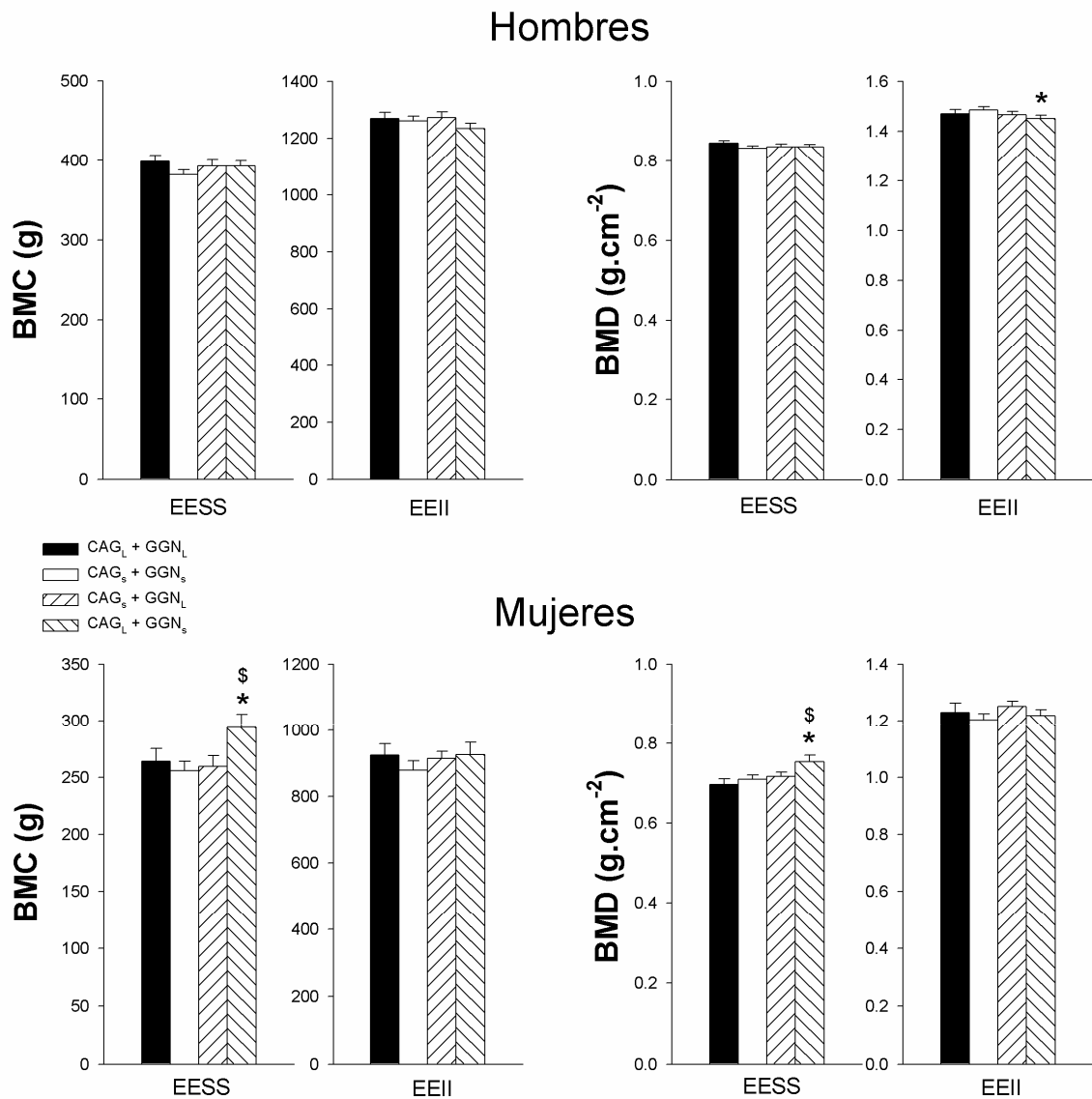


Figura 16. Contenido mineral óseo (BMC), y densidad mineral ósea (BMD), de las extremidades superiores (EESS) e inferiores (EEII) en hombres y mujeres. Los sujetos se agruparon como CAG_S si tenían un número de repeticiones ≤ 21 para los hombres y ≤ 22 para las mujeres, y CAG_L si tenían un número de repeticiones > 21 para los hombres y > 22 para las mujeres. El punto de corte para dividir los grupos para el polimorfismo GGN fue tener un número de repeticiones ≤ 23 tanto en hombres como en mujeres (GGN_S). Los sujetos que no cumplían esta condición fueron clasificados como GGN_L. Las cuatro combinaciones de haplotipos se definieron de la siguiente forma: CAG_L + GGN_L, CAG_S + GGN_S, CAG_S + GGN_L, y CAG_L + GGN_S. * $P < 0.05$ comparado con la combinación CAG_S + GGN_S. [§] $P < 0.05$ en la comparación con la combinación CAG_L + GGN_S.

Testosterona libre, masa ósea y polimorfismos del receptor de andrógenos en hombres.

En los hombres no observamos correlación entre el número de repeticiones CAG o GGN y los valores séricos de testosterona libre. Además, no existieron diferencias estadísticamente significativas en los valores basales de la concentración sérica de testosterona libre entre los grupos CAG_S y CAG_L (21.1 ± 11.3 y 21.1 ± 9.7 pmol/L, respectivamente, $P = 0.43$).

Aunque los valores de testosterona libre (FT), fueron un 13% superiores en el grupo GGN_S comparado con el grupo GGN_L, esta diferencia no alcanzó significación estadística (22.1 ± 11.2 y 19.6 ± 9.3 pmol/L, respectivamente, $P = 0.07$).

Se observaron correlaciones significativas entre el logaritmo de los valores de FT y el BMC en el cuerpo entero, cuello del fémur, triángulo de Ward, y las extremidades inferiores ($r_p = 0.15, 0.21, 0.18,$ y 0.12 , respectivamente, $P < 0.05$). El logaritmo de los valores de FT también se correlacionó con la BMD en el cuello del fémur, la región intertrocantérea, el trocánter mayor, triángulo de Ward y las extremidades inferiores ($r_p = 0.21, 0.13, 0.20, 0.22,$ y 0.17 , respectivamente, $P < 0.05$).

El análisis de regresión múltiple reveló que en los hombres, la FT explica un 4.6% de la variabilidad en la BMD de el cuello del fémur, y que el número de repeticiones CAG explica un 1.4% adicional, mientras que el logaritmo de las repeticiones CAG (LgCAG), no añade una mayor capacidad predictiva a la BMD del cuello del fémur (BMD del cuello del fémur = $1.23 + 0.136 \cdot FT - 0.281 \cdot LgCAG$, $r = 0.25$, $P < 0.05$).

Las concentraciones de testosterona libre en hombres fueron similares en los cuatro haplotipos estudiados (20.1 ± 9.1 , 22.4 ± 12.4 , 19.3 ± 9.5 , y 21.7 ± 10.0 pmol/L, para CAG_L+CGN_L, CAG_S+CGN_S, CAG_S+CGN_L, y CAG_L+CGN_S, respectivamente).

Testosterona libre, masa ósea y polimorfismos del receptor de andrógenos en mujeres.

En las mujeres, se observó una correlación inversa entre la FT y el número de repeticiones CAG ($r_p = -0.26$, $P = 0.05$). Sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones basales de FT entre los haplotipos CAG_S y CAG_L (3.8 ± 1.9 y 3.6 ± 1.8 pmol/L, respectivamente, $P = 0.70$) y entre los haplotipos GGN_S y GGN_L (3.9 ± 2.1 and 3.7 ± 1.6 pmol/L, respectivamente, $P = 0.65$). Tampoco se observó relación entre el BMC o el BMD en el cuerpo entero, la cadera y los valores basales de FT.

Aquellas mujeres con el haplotipo CAG_L mostraron una asociación negativa mas fuerte entre la concentración de FT y el número de repeticiones CAG ($r_s = -0.62$, $n=21$, $P<0.01$) que aquellas con el haplotipo CAG_S. Además, la concentración de FT correlacionó negativamente con la talla en el haplotipo CAG_L ($r_s = -0.41$, $n=21$, $P < 0.05$). Asimismo, la mujeres que poseían el haplotipo GGN_L correlacionaron positivamente los valores de FT y el BMC del cuello del fémur ($r = 0.47$, $n=31$, $P = 0.01$), así como con la BMD del cuello del fémur y con el trocánter mayor ($r = 0.40$ and 0.36 , respectivamente, $n = 31$, $P < 0.05$).

En las mujeres con el haplotipo CAG_L + GGN_L, el logaritmo de la concentración de FT correlacionó con la BMD de las extremidades superiores y el número de repeticiones CAG ($r_p = 0.67$ and -0.63 , $n=10$, $P < 0.05$).

Las concentraciones de FT en las mujeres pertenecientes a los cuatro haplotipos estudiados fueron similares.

4. DISCUSIÓN GENERAL

4.1 Efectos del entrenamiento de fuerza sobre la condición física y la respuesta hipertrófica en hombres y mujeres jóvenes.

En la actualidad, el entrenamiento de fuerza ha llegado a ser uno de los elementos fundamentales no sólo de la preparación del deportista de alto nivel, sino también para la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades crónicas (p.e. diabetes o enfermedades cardiovasculares o las asociadas al envejecimiento). El entrenamiento de fuerza tiene el objetivo de mejorar una o varias de las siguientes expresiones de fuerza y velocidad: La fuerza máxima, la fuerza explosiva o la máxima potencia. Se sabe que los hombres tienen una potencia absoluta mayor que las mujeres, al igual que una mayor potencia relativa cuando es expresada por kilogramo de masa corporal (Vandewalle et al. 1987) (Green 1995).

Sin embargo, diversos estudios han mostrado que la realización de un entrenamiento sistemático de la fuerza máxima se acompaña de incrementos significativos en la producción de fuerza y la masa muscular, independientemente de la edad y el sexo, siempre y cuando la intensidad y duración del periodo de entrenamiento sean suficientes (Cureton et al. 1988; Ivey et al. 2000; Lemmer et al. 2000; Lemmer et al. 2001; Staron et al. 1991; Walts et al. 2008).

De acuerdo con estos estudios, y en contraste con nuestra hipótesis, el entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos que se describe en el estudio II produjo ganancias similares en masa muscular y fuerza en ambos sexos. Tanto los hombres como las mujeres mostraron mejoras relativas similares en la fuerza dinámica máxima (1RM) (Lemmer et al. 2000; Ryan et al. 2004; Staron et al. 1994). Sin embargo, los hombres mejoraron significativamente la fuerza isométrica máxima en un mayor grado que las mujeres, aunque el efecto del género fue reducido. En contraste, la velocidad de carrera en el test de 30m mejoró solamente en las mujeres. Estos efectos se explican en parte por el grado similar (4-5%) de hipertrofia muscular en las extremidades inferiores, observado en ambos sexos en el estudio II, lo que coincide con lo encontrado por diversos estudios previos (Cureton et al. 1988; Ivey et al. 2000; Lemmer et al. 2000; Lemmer et al. 2001; Staron et al. 1991; Walts et al. 2008).

Los factores que pueden explicar estas mejoras en la producción de fuerza y potencia muscular son: el número de puentes cruzados de miosina que pueden interactuar con los filamentos de actina, el número de sarcómeros en paralelo, la tensión específica o fuerza que una fibra muscular puede ejercer por unidad de sección transversal, la longitud de la fibra y del músculo, el tipo de fibra y el ángulo de inserción/origen de la fibra (ángulo de penneación).

También, la fuerza que puede ejercer un músculo esquelético depende de varios factores de tipo neural. Por ejemplo, la habilidad del sistema nervioso para la máxima y rápida activación de los músculos agonistas (p.e. conseguido con el reclutamiento de unidades motoras activas), el incremento en su frecuencia de estimulación, el aumento en su estímulo de excitación, inhibición de los músculos antagonistas y de la capacidad para utilizar la energía potencial originada durante un ciclo estiramiento-acortamiento. Además de los factores anteriormente comentados, otras cuestiones relacionadas con las propiedades mecánicas del músculo como el ángulo articular y la longitud inicial del músculo al inicio de la activación, el tipo de activación y la velocidad de movimiento son también determinantes en la producción de tensión en el músculo.

4.2 Respuestas de la osteocalcina al entrenamiento de fuerza y su relación con el fenotipo muscular y la hipertrofia muscular.

Los resultados obtenidos en el estudio II sugieren que el fenotipo muscular influye la respuesta de la osteocalcina al entrenamiento de fuerza, de una forma tan significativa, que sólo el fenotipo muscular explica un 25% de la respuesta de la osteocalcina al entrenamiento de fuerza. Además, observamos que el aumento en los niveles séricos de osteocalcina fue mayor en aquellos sujetos que poseían un mayor porcentaje de MHC tipo II. Sin embargo, se requieren estudios de mayor duración que examinen si esta actividad osteoblástica incrementada que queda reflejada en una mayor concentración sérica de osteocalcina, se traduce en una mayor adquisición de masa ósea. La asociación entre el fenotipo muscular y el incremento en los niveles de osteocalcina puede ser explicada por la mayor habilidad de las fibras tipo II para generar tensiones más altas y rápidas en los huesos en los que se insertan (Schiaffino and Reggiani 1996).

El estudio II también muestra que el cambio en la concentración de osteocalcina está positivamente asociado con la hipertrofia muscular producida por el programa de entrenamiento de fuerza. Esto puede reflejar la estimulación simultánea de los huesos y las fibras musculares mediante los saltos y los ejercicios de pesas. De acuerdo con nuestra hipótesis, la ganancia de masa muscular libre de grasa en las extremidades inferiores permite explicar un 22% de la variación en la ganancia de BMC observada en el cuerpo entero. Este hallazgo concuerda con estudios previos con animales transgénicos que muestran que los fenotipos de masa muscular incrementada también muestran una mayor masa ósea (Hamrick et al. 2006). Un estudio realizado en humanos que incluyó 56 mujeres gemelas monozigóticas y 56 dizigóticas con una edad media de 45 años (rango 24-67), concluyó que los factores genéticos explican un 60-80% de la varianza en la BMD de la cadera, un 60-80% de la varianza en la masa muscular libre de grasa, y más de un 50% de su covarianza (Seeman et al. 1996). Este último resultado se puede interpretar como una

probabilidad de que la asociación entre una mayor masa muscular y una mayor BMD se pueda explicar por la regulación de la expresión de genes implicados en la regulación de la talla (Seeman et al. 1996). Sin embargo, los últimos estudios realizados en humanos muestran una asociación entre el incremento en la masa muscular y la ganancia de masa ósea (Vicente-Rodriguez et al. 2005).

4.3 La respuesta osteogénica a corto plazo al entrenamiento de fuerza es similar en hombres y mujeres jóvenes.

El estudio II muestra que 9 semanas de entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos es suficiente para provocar un pequeño, pero significativo aumento en el contenido mineral óseo, cuya magnitud y distribución regional es similar en hombres y mujeres adultos jóvenes. Además, los resultados aportados por el estudio II muestran por primera vez que la respuesta osteogénica a corto plazo al ejercicio es similar en hombres y mujeres adultos jóvenes, lo cual se ve reflejado en el aumento similar observado en la concentración sérica de osteocalcina y en los incrementos paralelo encontrados en el contenido mineral óseo del cuerpo entero y la espina lumbar. Estos hallazgos contrastan con el marcado dimorfismo sexual que se observa en adolescentes (peri- a postpuberal), que participaron en una intervención a nivel escolar durante ocho meses, que consistía en 10 minutos de saltos en lugar de un calentamiento tradicional en las clases de educación física (Weeks et al. 2008).

No existen estudios previos, ni aleatorios y ni controlados que hayan examinado las respuestas osteogénicas al mismo entrenamiento de fuerza en hombres y mujeres incluyendo sus respectivos grupos control. Las escasas evidencias publicadas hasta ahora carecen de los respectivos grupos control apropiados (Ryan et al. 2004). Un estudio particularmente interesante publicado por Ryan y col. (Ryan et al. 2004), muestra que tras un programa de entrenamiento de 6 meses de duración realizado con cargas de intensidad moderada (12-15RM) y distribuido en 3 sesiones semanales en el que participaron 10 hombres y 7 mujeres (rango de edad: 20-29 años), sólo mejoró el BMC del cuerpo entero en los hombres. Sin embargo, no se observó un efecto significativo del género en el test ANOVA, lo que sugiere una mayor respuesta osteogénica en los hombres. Lo anteriormente comentado coincide con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, con la diferencia de que los efectos encontrados en nuestro estudio se obtuvieron en un periodo de tiempo más corto y con un entrenamiento más intenso suplementado con saltos pliométricos. Además, los resultados obtenidos en el estudio II muestran una tendencia a una mayor mejora de la BMD en los hombres que en las mujeres. Permanece aún por determinar si un periodo de intervención más largo puede producir en última instancia una mejora de la BMD superior en los hombres que en las mujeres.

En contraste con los resultados obtenidos en el estudio II, no se han descrito efectos positivos tras una intervención de entrenamiento de fuerza (sin saltos pliometricos añadidos) en mujeres jóvenes (Chilibeck et al. 1996; Nindl et al. 2000). Esta discrepancia puede ser atribuida a las diferencias en el programa de entrenamiento y resalta la importancia de incluir saltos u otros ejercicios que impliquen impactos altos en el programa de entrenamiento.

4.4 Polimorfismos del receptor de andrógenos y masa muscular libre de grasa.

Polimorfismo CAG y masa muscular libre de grasa.

Los resultados recogidos en el estudio III demuestran que las mujeres que poseen un número de repeticiones del polimorfismo CAG ≤ 22 son de menor estatura, pero tienen una mayor masa muscular libre de grasa en el cuerpo entero, debido a una mayor masa muscular libre de grasa en las extremidades, observándose un efecto similar en las extremidades inferiores y superiores. Además, esta mayor masa muscular en las extremidades superiores se observa independientemente de si el brazo analizado es el dominante o el no dominante. Esto último indica que la influencia del polimorfismo CAG corto en la masa muscular es independiente del trabajo al que se ve sometido el músculo, y sugiere que un polimorfismo CAG corto no favorece la hipertrofia muscular en respuesta a la carga mecánica. De acuerdo con nuestra interpretación, la hipertrofia muscular encontrada en un estudio realizado por Woodhouse y col. tras 20 semanas de tratamiento con testosterona *Enanthate* en hombres, no debe de estar asociada con el número de repeticiones CAG o GGN (Woodhouse et al. 2003). Sin embargo, nosotros creemos que la respuesta hipertrófica al entrenamiento de fuerza debe ser examinada en sujetos con polimorfismos CAG y GGN cortos y largos para determinar la influencia de estos polimorfismos del gen del receptor de andrógenos en la respuesta hipertrófica a la carga mecánica.

Nuestros resultados en mujeres solamente pueden ser comparados con los de Walsh y col. (Walsh et al. 2005), los cuales estudiaron mujeres de mediana edad (media: 50 años). En este estudio, la masa muscular libre de grasa ajustada por la talla en las mujeres que poseían un número de repeticiones CAG ≥ 22 fue de $14.6 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, bastante similar a los $14.4 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ obtenidos en nuestro estudio en las mujeres con un número de repeticiones CAG >22 , a pesar de las diferencias de edad entre las dos muestras de población. Sin embargo, mientras Walsh y col. no observaron diferencias significativas en la masa libre de grasa apendicular y del cuerpo entero atribuibles al número de repeticiones CAG, nuestras mujeres con un número de repeticiones CAG ≤ 22 poseían una mayor masa libre de grasa y masa muscular en el cuerpo entero.

En concordancia con estudios previos, nuestros resultados no muestran ninguna asociación entre la talla y el número de repeticiones CAG en hombres (Walsh et al. 2005).

Sin embargo, en el grupo de las mujeres estudiado, el polimorfismo CAG largo se asoció con una talla mayor.

La administración de testosterona a adolescentes pre-puberales resulta en una menor talla en la edad adulta (Zachmann et al. 1976), esto indica que un mayor número de repeticiones del polimorfismo CAG puede influir en el crecimiento longitudinal durante la pubertad en las chicas, o extender el crecimiento prepuberal.

Aunque los hombres estudiados con un polimorfismo CAG >22 tenían una masa libre de grasa en el cuerpo entero ajustada por la altura² mayor (1.1%) que los grupos con los alelos cortos, esta diferencia no alcanzó significación estadística. Estos resultados contradicen los observados por Walsh y col. (2005), los cuales mostraron en su estudio un 2% más de masa muscular libre de grasa en los sujetos con las repeticiones CAG \geq 22, en un grupo de 294 hombres con una edad media de 73 años. La diferencia entre los dos estudios es posiblemente debida al hecho de que nuestros sujetos son mucho mas jóvenes (29 años de media), tienen más masa muscular apendicular pero menor masa libre de grasa ajustada por la altura² que los estudiados por Walsh y col. Este hecho sugiere que durante el envejecimiento, los hombres aumentan la masa libre de grasa en la región del tronco, debido a cambios en otros componentes de la masa muscular de esta región del organismo, como se demuestra mediante el recuento de potasio en el cuerpo entero (Lee and Chang 2003).

No se observaron diferencias significativas en la masa libre de grasa del cuerpo entero, altura o nivel de condición física entre los grupos CAG_S y CAG_L. Al igual que lo encontrado por Walsh y col. (2005).

Polimorfismo GGN y masa muscular libre de grasa.

El estudio III también investiga la influencia del número de repeticiones del polimorfismo GGN sobre la masa muscular en humanos sanos. De acuerdo con nuestra hipótesis existe una relación inversa entre el número de repeticiones del polimorfismo GGN y la masa muscular en las mujeres, pero este efecto parece estar confinado a las extremidades superiores (ambos brazos). Una tendencia similar se observó en los hombres. Aún permanece por determinar porque esta asociación está confinada a las extremidades superiores. Una posible explicación es que podría deberse a las diferencias regionales en la expresión del receptor de andrógenos entre la musculatura de los brazos y las piernas, que por otro lado puede ser modulada por las diferencias en la carga mecánica que soportan las extremidades inferiores y superiores (Bamman et al. 2001). Sin embargo, la relación entre el número de repeticiones GGN y la masa muscular fue similar para el brazo dominante y el no dominante. Además, no parece depender de la carga mecánica, la cual es mayor para el brazo dominante.

La posibilidad de una interacción entre el número de repeticiones de los polimorfismos CAG y GGN no había sido estudiada con anterioridad. Nosotros hemos observado que las mujeres que poseían la combinación de microsatélites CAG_S + GGN_S, tienen un 11% más de masa muscular que las mujeres con las combinaciones de microsatélites CAG_L + GGN_L o CAG_S + GGN_L. La combinación de microsatélites CAG_S + GGN_S ha sido asociada a una mayor señalización activada por andrógenos (Gonzalez et al. 2007; Navarro et al. 2002). Sin embargo, esta asociación no se observó en los hombres. Es posible que la ventaja conferida por la combinación CAG_S + GGN_S sobre la masa muscular y la condición física esté presente en un medio con una concentración de andrógenos baja, como ocurre en las mujeres.

4.5 Polimorfismos del receptor de andrógenos y condición física.

En concordancia con nuestra hipótesis, en el estudio III se muestra una correlación inversa entre el número de repeticiones CAG y la fuerza isométrica máxima ejercida en la posición de media sentadilla (y normalizada por la masa muscular de las extremidades inferiores), aunque este efecto fue estadísticamente significativo sólo en las mujeres. Además, para una determinada masa muscular, el número de repeticiones CAG podría explicar un 11% de la variabilidad en la fuerza isométrica máxima. Este porcentaje es considerable, puesto que estudios que utilizan gemelos dizigóticos y monozigóticos estiman que un 30-60% de la variabilidad en la masa muscular libre de grasa y fuerza muscular es debida a factores genéticos (Silventoinen et al. 2008).

La masa muscular de las extremidades inferiores es el máximo determinante de la fuerza isométrica máxima (Frontera et al. 1991) y el pico de potencia (Perez-Gomez et al. 2008), hasta tal punto, que las diferencias entre géneros en la fuerza isométrica máxima (como las que se muestran en el estudio III), o el pico de potencia (Perez-Gomez et al. 2008), se cancelan cuando la fuerza o la potencia son divididas por la masa libre de grasa de las extremidades inferiores.

Las mujeres del grupo CAG_S tienen una mejor condición física en el test de carrera en 300m. Este efecto no se acentúa cuando el haplotipo CAG_S fue combinado con el haplotipo GGN_S, a pesar de que éste último se asocia a una mayor altura de vuelo en las mujeres y los hombres cuando se combina con el haplotipo CAG_S.

El rendimiento en el salto está determinado por la composición corporal (Ara et al. 2006), y por factores que determinan la velocidad de la activación muscular y el ratio de desarrollo de la fuerza, entre los cuales es crítico el porcentaje de las fibras musculares tipo II (Bosco et al. 1983). El rendimiento en el test de carrera de 300m depende en gran medida de la masa muscular (Perez-Gomez et al. 2008), pero también de otros factores que determinan las propiedades contráctiles y metabólicas de los músculos, como es un mayor porcentaje de fibras musculares de contracción rápida (tipo II) y una mayor capacidad

anaeróbica (Calbet et al. 2003; Cristea et al. 2008). Esta mejor condición física también puede ser explicada por una mayor “calidad del músculo” (MQ, volumen fuerza/músculo del grupo muscular entrenado), ya que, para una masa muscular dada, el haplotipo CAG_S se asocia con una mayor fuerza isométrica máxima (Tracy et al. 1999).

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que en el haplotipo CAG_S puede conferir una ventaja funcional para tareas que requieran potencia muscular o un ratio metabólico muy alto como se observa durante los sprints prolongados.

Permanece aún por determinar si los polimorfismos CAG_S y/o GGN_S se asocian a una mayor proporción de fibras musculares tipo II y/o a una mejor capacidad anaeróbica.

Estudios realizados en animales indican que una señalización activada por andrógenos incrementada puede estimular la expresión de proteínas de contracción lenta específicas del músculo esquelético, mientras que inhibe proteínas de contracción rápida específicas del músculo esquelético (Altuwajiri et al. 2004). Sin embargo, no existen diferencias en la distribución de fibras musculares en los humanos (Schantz et al. 1983), y además se ha observado que 20 semanas de tratamiento con testosterona *Enanthate* no tiene ningún efecto en el tipo de fibras musculares en hombres (Sinha-Hikim et al. 2002).

Finalmente, debemos resaltar que en el estudio III observamos una asociación entre el número de repeticiones CAG y el VO_{2max}, el cual es un marcador de condición física aeróbica. Existen evidencias experimentales recientes que demuestran la asociación entre el VO_{2max} y menores niveles de morbilidad y mortalidad (Pedersen 2007). Además, un haplotipo CAG_L podría ser asociado también a una menor incidencia de mortalidad en mujeres, una posibilidad que queda por ser analizada.

EL VO_{2max} depende del reparto de oxígeno y de la capacidad oxidativa del músculo (Saltin and Calbet 2006). Esta última está determinada principalmente por la capacidad máxima de bombeo del corazón (Calbet et al. 2004), y la concentración de hemoglobina en sangre (Calbet et al. 2006). Puesto que se piensa que un genotipo CAG_L está asociado con efectos androgénicos reducidos, es difícil dilucidar cómo puede contribuir la señalización por andrógenos en la mejora del VO_{2max}. Una posibilidad es que la señalización andógenos-AR pueden jugar un papel en el remodelado cardiaco en respuesta al ejercicio (Marsh et al. 1998). Se necesitan mas estudios que confirmen esta asociación y expliquen cual es el mecanismo por el cual los haplotipos CAG_L pueden conferir una ventaja para el ejercicio de resistencia.

4.6 Polimorfismos del receptor de andrógenos y masa ósea.

En el estudio IV se muestran las relaciones existentes entre los polimorfismos CAG y GGN del receptor de andrógenos y la masa ósea. Cuando se analizan estos polimorfismos de forma separada, sin ajustar por la talla, no se observan asociaciones entre el número de repeticiones CAG o GGN y la densidad mineral ósea, independientemente del género de los

sujetos. La influencia del polimorfismo GGN no se había estudiado anteriormente, y, por lo tanto, no podemos comparar nuestros resultados con otros estudios. En cuanto al polimorfismo CAG, en la literatura existen datos contradictorios en relación con el número de repeticiones CAG y la BMD. Por ejemplo, en hombres de mediana edad (Remes et al. 2003), ancianos (Van Pottelbergh et al. 2001), así como en mujeres postmenopausicas (Langdahl et al. 2003; Salmen et al. 2003; Tofteng et al. 2004), no se encontró asociación. Sin embargo, otros estudios muestran una correlación positiva entre la BMD de la espina lumbar y el cuello del fémur con el número de repeticiones del polimorfismo CAG en hombres mayores de 40 años (Langdahl et al. 2003; Stiger et al. 2008), mientras que esta misma correlación pero de forma negativa se observa en mujeres postmenopausicas con polimorfismos de repetición CAG largos (Langdahl et al. 2003). Yamada y col. encontraron en su estudio una asociación inversa entre la longitud de repeticiones del polimorfismo CAG y la BMD de la espina lumbar y cuerpo entero de mujeres japonesas premenopáusicas, pero no en las postmenopausicas. En este estudio, la BMD era menor en aquellas mujeres con dos alelos CAG ≥ 23 que en aquellas con uno o dos alelos CAG ≤ 22 (Yamada et al. 2005).

En contradicción con Langdahl y col (Langdahl et al. 2003), y de acuerdo con nuestro estudio IV, Sowers y col, observaron que las mujeres premenopausicas con un rango de edad de 28-48 años, con una BMD del cuello del fémur en el menor quintil de la población estudiada, poseen una presencia mayor de genotipos CAG cortos en ambos alelos (Sowers et al. 1999). Este patrón de sobre-representación proporcional genotípica se observó también en la BMD de la espina lumbar y el cuerpo entero, así como en los niveles basales de osteocalcina (Sowers et al. 1999).

Algunas de estas discrepancias reflejan la naturaleza poligénica de la influencia genética sobre la masa ósea y el impacto de otros factores como son la edad, el género, el estatus nutricional, la raza, el estilo de vida, la carga mecánica a la que se somete el esqueleto, y la región esquelética que se toma en consideración para los estudios entre otros, los cuales se sabe que influyen el metabolismo óseo ((Pocock et al. 1987; Slemenda et al. 1991; Slemenda et al. 1997; Soroko et al. 1994; Vicente-Rodriguez et al. 2007). Cabe destacar el hecho de que incluso estudios realizados en la misma población, por ejemplo sujetos escandinavos, pero llevados a cabo en diferentes países han conseguido resultados diferentes (Langdahl et al. 2003; Remes et al. 2003; Salmen et al. 2003; Stiger et al. 2008). Además, en los estudios en los cuales se ha encontrado una asociación entre el número de repeticiones CAG y la BMD, la significación de esta relación ha sido baja. Por ejemplo, el número de repeticiones del polimorfismo CAG sólo puede explicar una pequeña parte de la varianza en la BMD, y sólo en regiones esqueléticas específicas.

Por lo tanto, parece claro que otros factores que influyen la BMD prevalecen sobre el número de repeticiones del polimorfismo CAG.

4.7 Polimorfismos del receptor de andrógenos y testosterona libre.

Estudios previos muestran que no existe correlación entre el número de repeticiones CAG y la concentración sérica de testosterona libre en hombres de mediana edad (Krithivas et al. 1999; Stiger et al. 2008) y ancianos (Van Pottelbergh et al. 2001). Nuestro estudio IV muestra que además no existe asociación entre el número de repeticiones CAG o GGN y los niveles de testosterona libre en hombres jóvenes. Como esperábamos, observamos una asociación positiva entre la BMD y los niveles de testosterona libre en los hombres (Greendale et al. 1997). Sin embargo, sólo observamos una relación entre los niveles de testosterona libre y la masa ósea en las mujeres con los polimorfismos GGN largos.

Es interesante resaltar un estudio reciente que muestra una interacción entre los niveles séricos de testosterona libre, el número de repeticiones del polimorfismo CAG y la BMD femoral en hombres suecos sanos (Stiger et al. 2008). En este estudio se demuestra que los hombres que tienen bajas concentraciones de testosterona libre y poseen polimorfismos CAG cortos tienen la BMD del cuello del fémur más baja. Los resultados aportados por nuestro estudio IV confirman esta interacción entre testosterona libre, polimorfismos CAG cortos y BMD del cuello del fémur. Sin embargo, nuestros resultados sólo concuerdan en parte con los de Stiger y col. Esto es así puesto que nuestro estudio muestra una asociación positiva entre la testosterona libre y la BMD, del mismo modo que obtuvieron Stigel y col. pero por otro lado, los resultados aportados por el estudio IV parecen sugerir que el efecto de la testosterona libre sobre la BMD femoral está acentuado en los hombres que poseen los CAG cortos, resultado opuesto al obtenido por Stigel y col. (Stiger et al. 2008). Estas discrepancias pueden ser explicadas, a parte de por las diferencias de edad de estas poblaciones, por las diferencias en raza y por la influencia del medio ambiente.

La correlación negativa que se observa en el estudio IV entre la testosterona libre y el número de repeticiones del polimorfismo CAG del AR es similar a la que se muestra con la androstenediona ($r=-0.21$) y testosterona total ($r=-0.20$) en mujeres con un rango de edad de 34 a 55 años, con estatus menstruales diferentes (Jaaskelainen et al. 2008). Westberg y col (Westberg et al. 2001) mostraron que mujeres con los dos alelos cortos poseían mayores concentraciones de testosterona libre que aquellas con dos alelos largos.

Los resultados que se muestran en el estudio IV representan la media bi-alélica, y la presencia en uno de los dos alelos de repeticiones CAG menores a 17 ha sido asociada con menores valores de testosterona libre (Westberg et al. 2001). Esto último implica que la influencia del número de repeticiones CAG sobre la testosterona libre no es lineal, como se refleja en la correlación negativa que se observa en el estudio IV entre el logaritmo de la concentración de testosterona libre y el número de repeticiones CAG. Por tanto, nuestros resultados apoyan el concepto de que en las mujeres con un número de repeticiones bajas

de CAG la concentración de testosterona libre es mayor, y viceversa. Sin embargo, nuestros datos también muestran la correlación inversa que existe entre la concentración de testosterona libre y el número de repeticiones CAG en las mujeres que tienen una media bialélica de repeticiones CAG por encima de 22. Esta relación inversa apoya la idea de que los receptores de andrógenos ejercen una influencia estimuladora en la producción de andrógenos, puesto que las mujeres con menor actividad de los receptores de andrógenos podrían tener concentraciones de andrógenos ligeramente disminuidas (Westberg et al. 2001). De hecho, la administración de antagonistas del receptor de andrógenos reduce la producción de andrógenos en las mujeres (Venturoli et al. 1999), como ocurre también en los ovarios (Jaaskelainen et al. 2008).

En contraste, Hietala y col. (2007) muestran que no existe correlación entre la media del número de repeticiones del polimorfismo CAG o GGC y los niveles de testosterona entre mujeres que usan contraceptivos y en las que no los usan. Ni la homocigosidad, ni la fase del ciclo menstrual, ni el uso de contraceptivos orales parecen tener influencia en las concentraciones totales de testosterona (Hietala et al. 2007)

La influencia de las repeticiones GGN del receptor de andrógenos sobre la testosterona libre sólo ha sido estudiada por Hiala y col. De acuerdo con nuestros resultados, Hieala y col. muestran que no existe relación entre la testosterona y el número de repeticiones GGN en mujeres que no usan contraceptivos orales (Hietala et al. 2007). Sin embargo, entre aquellas que si usan contraceptivos orales, los menores valores de testosterona libre se vieron en la fase folicular (días 5-10) del ciclo menstrual de las mujeres con dos alelos GGC largos (Hietala et al. 2007), pero no en la fase luteal media (días 18-23).

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Esta tesis aporta nuevos conocimientos sobre los mecanismos que determinan la respuesta hipertrófica muscular al ejercicio en hombres y mujeres jóvenes y sanos, así como los mecanismos que determinan la respuesta osteogénica al entrenamiento de fuerza. Por otro lado, las investigaciones realizadas sobre los polimorfismos del gen del receptor de andrógenos permiten explicar parte de la variabilidad de variables de composición corporal como son la cantidad de masa muscular y ósea así como el rendimiento de variables de condición física en individuos sanos. Estos conocimientos son de gran interés en medicina, especialmente para diseñar estrategias terapéuticas para tratar enfermedades y procesos que cursan con pérdida de masa muscular y ósea, como son la sarcopenia y la osteoporosis. También tiene interés en el ámbito de las ciencias del deporte, de cara a poder diseñar programas de entrenamiento más eficaces.

Las principales conclusiones alcanzadas con los estudios integrados en esta tesis doctoral son las siguientes:

- 1) No existe dimorfismo sexual en la respuesta hipertrófica al entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos a corto plazo
- 2) Nueve semanas de entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos no afectan a las concentraciones basales de testosterona libre, cortisol, ni el ratio testosterona libre-cortisol en hombres y mujeres jóvenes y sanos.
- 3) Nueve semanas de entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos producen un aumento de la proporción de cadena pesada de miosina (MHC) tipo IIa en el músculo vasto lateral del cuádriceps.
- 4) El fenotipo muscular influye en la respuesta de la osteocalcina al entrenamiento de fuerza.
- 5) La respuesta osteogénica es similar en hombres y mujeres sometidos al mismo programa de entrenamiento de fuerza combinado con saltos pliométricos a corto plazo.
- 6) Los polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos influyen en la masa muscular de las mujeres jóvenes, pero no la de los hombres.
- 7) Los polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos influyen en la condición física de las mujeres jóvenes, pero no la de los hombres.

- 8) El polimorfismo CAG del gen del receptor de andrógenos influncia la masa ósea en mayor grado que el polimorfismo GGN.
- 9) La concentración sérica de testosterona libre juega un papel importante en la influencia del polimorfismo CAG del gen del receptor de andrógenos sobre la masa ósea en hombres, pero no en mujeres.

6. APLICACIONES PRÁCTICAS Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.

Las principales aplicaciones y perspectivas de futuro (en relación con las conclusiones) alcanzadas con los estudios integrados en esta tesis doctoral son las siguientes:

- 1) El grado de hipertrofia y mejora de variables de condición física similares mostrados en el estudio II desarrollado en esta tesis, confirma que no es necesario realizar entrenamientos diferentes para hombres y mujeres con la finalidad de aumentar la masa muscular, siempre que se apliquen al programa de entrenamiento intensidades, volumen, frecuencia y períodos de descanso adecuados.
- 2) Según el estudio II, el fenotipo muscular como variable única explica un 25% de la respuesta osteogénica al entrenamiento de fuerza. Los sujetos con un mayor porcentaje de MHC tipo II experimentan una mayor ganancia en la concentración basal de osteocalcina. Esta conclusión permite explicar parte de la variabilidad de la respuesta osteogénica al entrenamiento de fuerza, aunque son necesarios más estudios a largo plazo para determinar hasta que punto el fenotipo muscular determina el potencial osteogénico en respuesta al ejercicio.
- 3) El estudio II muestra un aumento similar en hombres y mujeres de la concentración sérica de osteocalcina; así como aumentos de forma paralela en el contenido mineral óseo del cuerpo entero y la columna lumbar. Por lo cual, no hay motivos aparentes para entrenar de forma diferente o suplementar el entrenamiento de las mujeres jóvenes con intensidades extra. Esto puede suponer por otro lado, la protección frente a lesiones causadas por entrenar a intensidades muy altas y una ayuda a la hora de diseñar entrenamientos con el objetivo de prevenir la osteoporosis a edades más avanzadas.
- 4) En las mujeres, el estudio III muestra que un número de repeticiones $CAG \leq 22$ está asociado a una mayor cantidad de masa muscular y a una mayor fuerza muscular, incluso ajustando la talla de los sujetos, lo cual implica una mayor calidad del músculo. Esta relación es más intensa para el polimorfismo CAG que para el polimorfismo GGN. Los hombres jóvenes no muestran dicha asociación. Esta conclusión

- 5) El estudio III muestra que, en las mujeres, un número de repeticiones $CAG \leq 22$ está asociado a una mayor altura de vuelo en saltos a una mayor capacidad de sprint, y por otro lado, con una mayor capacidad aeróbica. Los hombres jóvenes no muestran dicha asociación. Esta conclusión permite explicar parte de la variabilidad de origen genético en la capacidad de mejora al entrenamiento. Dada la relevancia de la capacidad aeróbica para la salud, se necesitan estudios que investiguen la longitud de este polimorfismo con una menor mortalidad y/o morbilidad.

- 6) Tanto en hombres como en mujeres, en el estudio IV se observaron asociaciones negativas entre el número de repeticiones CAG y la masa ósea. El polimorfismo GGN influyó sólo cuando se combinaron los haplotipos. Esta conclusión esclarece en parte la variabilidad de origen genético de la cantidad de masa ósea independientemente del estilo de vida de los sujetos. Queda por determinar si estos polimorfismos también determinan la respuesta osteogénica al entrenamiento.

7. BIBIOGRAFÍA

- Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE (1997) The localization of androgen receptors in human bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82: 3493-3497
- Adams GR, Caiozzo VJ, Haddad F, Baldwin KM (2002) Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *American journal of physiology* 283: C1182-1195
- Albright F RE (1948) Metabolic bone disease: osteoporosis. In: Albright F, Reifenstein EC, editors. *The parathyroid glands and metabolic bone disease*. Baltimore: Williams and Wilkins: 145-204
- Alfredson H, Nordstrom P, Lorentzon R (1996) Total and regional bone mass in female soccer players. *Calcified tissue international* 59: 438-442
- Altuwajiri S, Lee DK, Chuang KH, Ting HJ, Yang Z, Xu Q, Tsai MY, Yeh S, Hanchett LA, Chang HC, Chang C (2004) Androgen receptor regulates expression of skeletal muscle-specific proteins and muscle cell types. *Endocrine* 25: 27-32
- Alway SE, Gonyea WJ, Davis ME (1990) Muscle fiber formation and fiber hypertrophy during the onset of stretch-overload. *The American journal of physiology* 259: C92-102
- Alway SE, Grumbt WH, Gonyea WJ, Stray-Gundersen J (1989) Contrasts in muscle and myofibers of elite male and female bodybuilders. *J Appl Physiol* 67: 24-31
- 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 I, Vicente-Rodriguez G, Perez-Gomez J, Jimenez-Ramirez J, Serrano-Sanchez JA, Dorado C, Calbet JA (2006) Influence of extracurricular sport activities on body composition and physical fitness in boys: a 3-year longitudinal study. *International journal of obesity* (2005) 30: 1062-1071
- Armstrong R (1988) *Muscle fiber recruitment patterns and their metabolic correlates*. Mac Millan, New York
- Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H (2005) Selective activation of AMPK-PGC-1 α 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. *The American journal of physiology* 276: C120-127
- Bailey AJ, Wotton SF, Sims TJ, Thompson PW (1992) Post-translational modifications in the collagen of human osteoporotic femoral head. *Biochemical and biophysical research communications* 185: 801-805
- Bailey CA, Brooke-Wavell K (2008) Exercise for optimising peak bone mass in women. *The Proceedings of the Nutrition Society* 67: 9-18
- Ballor DL, Becque MD, Katch VL (1987) Metabolic responses during hydraulic resistance exercise. *Medicine and science in sports and exercise* 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
- Banse X, Sims TJ, Bailey AJ (2002) Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res* 17: 1621-1628
- Baumann G (1991) Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocrine reviews* 12: 424-449
- Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC (1995) Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *The Journal of clinical investigation* 95: 2886-2895
- Ben-Hur H, Thole HH, Mashiah A, Insler V, Berman V, Shezen E, Elias D, Zuckerman A, Ornoy A (1997) Estrogen, progesterone and testosterone receptors in human fetal cartilaginous tissue: immunohistochemical studies. *Calcified tissue international* 60: 520-526
- Bergstrom J (1975) Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 35: 609-616
- Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW (2001) Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *The Journal of endocrinology* 170: 27-38
- Bland R (2000) Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond)* 98: 217-240
- 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
- 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. *The Proceedings of the Nutrition Society* 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. *The Journal of physiology* 553: 213-220
- Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J (2001) Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86: 2309-2314
- Borst SE (2004) Interventions for sarcopenia and muscle weakness in older people. *Age and ageing* 33: 548-555
- Borst SE, De Hoyos DV, Garzarella L, Vincent K, Pollock BH, Lowenthal DT, Pollock ML (2001) Effects of resistance training on insulin-like growth factor-I and IGF binding proteins. *Medicine and science in sports and exercise* 33: 648-653
- Bosco C, Komi PV, Tihanyi J, Fekete G, Apor P (1983) Mechanical power test and fiber composition of human leg extensor muscles. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 51: 129-135
- Boskey AL, Wright TM, Blank RD (1999) Collagen and bone strength. *J Bone Miner Res* 14: 330-335
- 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
- Bouxsein ML, Karasik D (2006) Bone geometry and skeletal fragility. *Curr Osteoporos Rep* 4: 49-56
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of neurology* 23: 369-379
- Brostrom MA, Brostrom CO (2003) Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell calcium* 34: 345-363
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relax F (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of anatomy* 202: 59-68
- Buller RE, Sood AK, Lallas T, Buekers T, Skilling JS (1999) Association between nonrandom X-chromosome inactivation and BRCA1 mutation in germline DNA of patients with ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 339-346
- Burger EH, Klein-Nulend J (1999) Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J* 13 Suppl: S101-112
- Burr DB, Forwood MR, Fyhrie DP, Martin RB, Schaffler MB, Turner CH (1997) Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J Bone Miner Res* 12: 6-15
- 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, Chavarren J, Dorado C (1997) Fractional use of anaerobic capacity during a 30- and a 45-s Wingate test. *European journal of applied physiology and occupational 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
- Calbet JA, Dorado C, Diaz-Herrera P, Rodriguez-Rodriguez LP (2001) High femoral bone mineral content and density in male football (soccer) players. *Medicine and science in sports and exercise* 33: 1682-1687
- Calbet JA, Jensen-Urstad M, van Hall G, Holmberg HC, Rosdahl H, Saltin B (2004) Maximal muscular vascular conductances during whole body upright exercise in humans. *The Journal of physiology* 558: 319-331
- Calbet JA, Lundby C, Koskolou M, Boushel R (2006) Importance of hemoglobin concentration to exercise: acute manipulations. *Respiratory physiology & neurobiology* 151: 132-140
- Calbet JA, Moysi JS, Dorado C, Rodriguez LP (1998) Bone mineral content and density in professional tennis players. *Calcified tissue international* 62: 491-496
- 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 resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *European journal of applied physiology* 88: 50-60
- Carel JC (2005) Growth hormone in Turner syndrome: twenty years after, what can we tell our patients? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90: 3793-3794
- Carrascosa A, Audi L, Ferrandez MA, Ballabriga A (1990) Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone-binding

- sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 70: 134-140
- 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
- Clarke BL, Khosla S (2008) Androgens and bone. *Steroids*
- 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
- Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC (1989) Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 854-857
- Compston JE (2001) Sex steroids and bone. *Physiological reviews* 81: 419-447
- Crabbe P, Bogaert V, De Bacquer D, Goemaere S, Zmierzczak H, Kaufman JM (2007) Part of the interindividual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback set point: contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92: 3604-3610
- Cramer 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. *The Journal of physiology* 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
- Cristea A, Korhonen MT, Hakkinen K, Mero A, Alen M, Sipila S, Viitasalo JT, Koljonen MJ, Suominen H, Larsson L (2008) Effects of combined strength and sprint training on regulation of muscle contraction at the whole-muscle and single-fibre levels in elite master sprinters. *Acta physiologica (Oxford, England)* 193: 275-289
- Cureton KJ, Collins MA, Hill DW, McElhannon FM, Jr. (1988) Muscle hypertrophy in men and women. *Medicine and science in sports and exercise* 20: 338-344
- Currey JD (1979) Changes in the impact energy absorption of bone with age. *J Biomech* 12: 459-469
- Currey JD (1988) The effect of porosity and mineral content on the Young's modulus of elasticity of compact bone. *J Biomech* 21: 131-139
- Currey JD, Brear K, Zioupos P (1996) The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *J Biomech* 29: 257-260
- Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL (1994) The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic acids research* 22: 3181-3186
- Chandler RM, Byrne HK, Patterson JG, Ivy JL (1994) Dietary supplements affect the anabolic hormones after weight-training exercise. *J Appl Physiol* 76: 839-845
- Chilibeck PD, Calder A, Sale DG, Webber CE (1996) Twenty weeks of weight training increases lean tissue mass but not bone mineral mass or density in healthy, active young women. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 1180-1185
- 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
- Deschenes MR, Kraemer WJ (2002) Performance and physiologic adaptations to resistance training. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 81: S3-16
- Dhawan J, Rando TA (2005) Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends in cell biology* 15: 666-673
- DiBrezzo R, Shadden BB, Raybon BH, Powers M (2005) Exercise intervention designed to improve strength and dynamic balance among community-dwelling older adults. *Journal of aging and physical activity* 13: 198-209
- Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER (2005) Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *The Prostate* 62: 133-139
- 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
- Dunn SE, Burns JL, Michel RN (1999) Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* 274: 21908-21912
- Egan E, Reilly T, Giacomoni M, Redmond L, Turner C (2006) Bone mineral density among female sports participants. *Bone* 38: 227-233

- el Haj AJ, Minter SL, Rawlinson SC, Suswillo R, Lanyon LE (1990) Cellular responses to mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res* 5: 923-932
- 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
- Eriksen EF (1986) Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocrine reviews* 7: 379-408
- Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K (1988) Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *The Biochemical journal* 252: 495-500
- Faber PW, Kuiper GG, van Rooij HC, van der Korput JA, Brinkmann AO, Trapman J (1989) The N-terminal domain of the human androgen receptor is encoded by one, large exon. *Molecular and cellular endocrinology* 61: 257-262
- Fahey TD, Rolph R, Mounghme P, Nagel J, Mortara S (1976) Serum testosterone, body composition, and strength of young adults. *Medicine and science in sports* 8: 31-34
- Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S (2000) Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *The Journal of clinical investigation* 106: 1553-1560
- Fantner GE, Birkedal H, Kindt JH, Hassenkam T, Weaver JC, Cutroni JA, Bosma BL, Bawazer L, Finch MM, Cidade GA, Morse DE, Stucky GD, Hansma PK (2004) Influence of the degradation of the organic matrix on the microscopic fracture behavior of trabecular bone. *Bone* 35: 1013-1022
- 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
- Frontera WR, Hughes VA, Lutz KJ, Evans WJ (1991) A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 78-yr-old men and women. *J Appl Physiol* 71: 644-650
- Frost HM (1987) Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *The Anatomical record* 219: 1-9
- Frost HM (1990) Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the bone modeling problem. *The Anatomical record* 226: 403-413
- Frost HM (1993) Wolff's law: an 'MGS' derivation of Gamma in the Three-Way Rule for mechanically controlled lamellar bone modeling drifts. *Bone Miner* 22: 117-127
- Frost HM, Jee WS (1992) On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18: 227-236
- 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
- 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
- Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA, Gurley CM, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE (2004) Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol* 97: 1082-1090
- Gao T, Marcelli M, McPhaul MJ (1996) Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 59: 9-20
- 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
- Geneser F (2000) *Histología sobre bases moleculares*. 3th ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina: 264-297
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW (1997) The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3320-3323
- 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. *European journal of applied physiology* 103: 399-409
- Glass DJ (2003) Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature cell biology* 5: 87-90
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37: 1974-1984
- Goddard D, Kleerekoper M (1998) The epidemiology of osteoporosis. Practical implications for patient care. *Postgraduate medicine* 104: 54-56, 65, 69-72
- Gonzalez A, Javier Dorta F, Rodriguez G, Brito B, Rodriguez MA, Cabrera A, Diaz-Chico JC, Reyes R, Aguirre-Jaime A, Nicolas Diaz-Chico B (2007) Increased risk of breast cancer in women bearing a combination of large CAG and GGN repeats in the exon 1 of the androgen receptor gene. *Eur J Cancer* 43: 2373-2380
- 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
- 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. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 22: 244-255
- Green S (1995) Measurement of anaerobic work capacities in humans. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 19: 32-42
- Greendale GA, Edelstein S, Barrett-Connor E (1997) Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 12: 1833-1843
- Grundberg E, Brandstrom H, Ribom EL, Ljunggren O, Mallmin H, Kindmark A (2004) Genetic variation in the human vitamin D receptor is associated with muscle strength, fat mass and body weight in Swedish women. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 150: 323-328
- Guadalupe-Grau A, Fuentes T, Guerra B, Calbet JAL (2008) Exercise and bone mass in adults. *Sports medicine (Auckland, NZ)*: In press
- Haapasalo H, Kannus P, Sievanen H, Heinonen A, Oja P, Vuori I (1994) Long-term unilateral loading and bone mineral density and content in female squash players. *Calcified tissue international* 54: 249-255
- Haarbo J, Gotfredsen A, Hassager C, Christiansen C (1991) Validation of body composition by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). *Clinical physiology (Oxford, England)* 11: 331-341
- Hakkinen K, Pakarinen A, Alen M, Kauhanen H, Komi PV (1987) Relationships between training volume, physical performance capacity, and serum hormone concentrations during prolonged training in elite weight lifters. *International journal of sports medicine* 8 Suppl 1: 61-65
- Hamrick MW, Samaddar T, Pennington C, McCormick J (2006) Increased muscle mass with myostatin deficiency improves gains in bone strength with exercise. *J Bone Miner Res* 21: 477-483
- 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. *Scandinavian journal of medicine & science in 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. *International journal of sports medicine* 23: 484-488
- 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. *Exercise and sport sciences reviews* 33: 63-68
- Hawkey A (2003) The importance of exercising in space. *Interdiscip Sci Rev* 28: 130-138
- 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
- Heemers HV, Tindall DJ (2007) Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine reviews* 28: 778-808
- Henneman E, Somjen G, Carpenter DO (1965) Functional Significance of Cell Size in Spinal Motoneurons. *Journal of neurophysiology* 28: 560-580
- Herbst KL, Bhasin S (2004) Testosterone action on skeletal muscle. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 7: 271-277
- Hert J, Fiala P, Petrtyl M (1994) Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man. *Bone* 15: 269-277
- Hietala M, Sandberg T, Borg A, Olsson H, Jernstrom H (2007) Testosterone levels in relation to oral contraceptive use and the androgen receptor CAG and GGC length polymorphisms in healthy young women. *Human reproduction (Oxford, England)* 22: 83-91
- Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S (2002) Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 147: 269-273
- Hofbauer LC, Hicok KC, Khosla S (1998) Effects of gonadal and adrenal androgens in a novel androgen-responsive human osteoblastic cell line. *Journal of cellular biochemistry* 71: 96-108
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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

- Hunter GK, Goldberg HA (1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8562-8565
- 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
- Inoue K, Yamasaki S, Fushiki T, Okada Y, Sugimoto E (1994) Androgen receptor antagonist suppresses exercise-induced hypertrophy of skeletal muscle. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 69: 88-91
- Ivey FM, Roth SM, Ferrell RE, Tracy BL, Lemmer JT, Hurlbut DE, Martel GF, Siegel EL, Fozard JL, Jeffrey Metter E, Fleg JL, Hurley BF (2000) Effects of age, gender, and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training. *The journals of gerontology* 55: M641-648
- Izquierdo M (2009) Relative and absolute early phase acute hormonal, cytokine and metabolic responses after resistance training. *Med Sci Sports Exerc* (submitted)
- Izquierdo M, Ibanez J, Calbet JA, Gonzalez-Izal M, Navarro-Amezqueta I, Granados C, Malanda A, Idoate F, Gonzalez-Badillo JJ, Häkkinen K, Kraemer WJ, Tirapu I, Gorostiaga EM (2009) Neuromuscular fatigue after resistance training. *International journal of sports medicine: In Press*
- Izquierdo M, Ibanez J, Gonzalez-Badillo JJ, Häkkinen 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
- Jaaskelainen J, Korhonen S, Kuulasmaa T, Kurl S, Niskanen L, Vanhala M, Hippelainen M, Voutilainen R, Heinonen S (2008) Androgen receptor gene CAG repeat length in women with metabolic syndrome. *Gynecol Endocrinol* 24: 411-416
- Johnell O, Kanis J (2005) Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2: S3-7
- Junqueira LCaC, J. (2000) *Histología básica, texto y atlas*. 5th edición. Barcelona; Madson.: 127-147
- Juul A (2001) The effects of oestrogens on linear bone growth. *Human reproduction update* 7: 303-313
- Kanis J (1996) *Osteoporosis*. Sheffield: Blackwell Science Ltd: 26-91
- Kanis JA, Melton LJ, 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N (1994) The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9: 1137-1141
- Kannus P, Haapasalo H, Sievanen H, Oja P, Vuori I (1994) The site-specific effects of long-term unilateral activity on bone mineral density and content. *Bone* 15: 279-284
- Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, Mohan S, Jennings J, Wergedal J, Baylink D (1990) Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 71: 1322-1329
- Kasperk C, Helmboldt A, Borcsok I, Heuthe S, Cloos O, Niethard F, Ziegler R (1997a) Skeletal site-dependent expression of the androgen receptor in human osteoblastic cell populations. *Calcified tissue international* 61: 464-473
- Kasperk CH, Wakley GK, Hierl T, Ziegler R (1997b) Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro. *J Bone Miner Res* 12: 464-471
- Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ (1989) Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* 124: 1576-1578
- Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L (1995) Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n-expanded neuropathies. *Human molecular genetics* 4: 523-527
- Kerrigan JR, Rogol AD (1992) The impact of gonadal steroid hormone action on growth hormone secretion during childhood and adolescence. *Endocrine reviews* 13: 281-298
- Khosla S, Melton LJ, 3rd, Riggs BL (2002) Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87: 1443-1450
- 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
- Komi PV, Kaneko M, Aura O (1987) EMG activity of the leg extensor muscles with special reference to mechanical efficiency in concentric and eccentric exercise. *International journal of sports medicine* 8 Suppl 1: 22-29
- 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 (2002) 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 heavy-resistance 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, Maresch C, Fry AC (1991) Endogenous anabolic hormonal and growth

- factor responses to heavy resistance exercise in males and females. *International journal of sports medicine* 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
- Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M, Longcope C, McKinlay JB, Kantoff PW (1999) Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *The Journal of endocrinology* 162: 137-142
- Kukuvitis A, Georgiou I, Bouba I, Tzirka A, Giannouli CH, Yapijakis C, Tarlatzis B, Bontis J, Lolis D, Sofikitis N, Papadimas J (2002) Association of oestrogen receptor alpha polymorphisms and androgen receptor CAG trinucleotide repeats with male infertility: a study in 109 Greek infertile men. *International journal of andrology* 25: 149-152
- Langdahl BL, Stenkjaer L, Carstens M, Tofteng CL, Eriksen EF (2003) A CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene is associated with reduced bone mass and increased risk of osteoporotic fractures. *Calcified tissue international* 73: 237-243
- 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. *European journal of applied physiology* 87: 481-488
- Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, Chow JW (1995) Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *The American journal of physiology* 268: E318-327
- Leder BZ, LeBlanc KM, Schoenfeld DA, Eastell R, Finkelstein JS (2003) Differential effects of androgens and estrogens on bone turnover in normal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88: 204-210
- Lee DK, Chang C (2003) Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88: 4043-4054
- 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, Hurlbut DE, Martel GF, Tracy BL, Ivey FM, Metter EJ, Fozard JL, Fleg JL, Hurley BF (2000) Age and gender responses to strength training and detraining. *Medicine and science in sports and exercise* 32: 1505-1512
- 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
- Levine DA, Boyd J (2001) The androgen receptor and genetic susceptibility to ovarian cancer: results from a case series. *Cancer research* 61: 908-911
- Lewis DA, Kamon E, Hodgson JL (1986) Physiological differences between genders. Implications for sports conditioning. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 3: 357-369
- Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ (1999) Regulated expression of the bone-specific osteocalcin gene by vitamins and hormones. *Vitamins and hormones* 55: 443-509
- Lian JB, G.S. (1999) The cells of bone. In: *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego, California: Academic Press: 167-186
- Linnamo V, Newton RU, Hakkinen K, Komi PV, Davie A, McGuigan M, Triplett-McBride T (2000) Neuromuscular responses to explosive and heavy resistance loading. *J Electromyogr Kinesiol* 10: 417-424
- Long YC, Widegren U, Zierath JR (2004) Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. *The Proceedings of the Nutrition Society* 63: 227-232
- López Calbet JA, Dorado García C, Chavarren Cabrero J (1996) Evaluación de la composición corporal mediante absorciometría fotónica dual de rayos X: aplicaciones y limitaciones en el ámbito del deporte. *Investigaciones en Ciencias del Deporte*.
- López Chicharro J, Fernandez Vaquero A (2006) *Fisiología del Ejercicio*. 5 Ed Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science (New York, NY)* 240: 327-330
- Lyon MF (1999) X-chromosome inactivation. *Curr Biol* 9: R235-237
- Marcell TJ (2003) Sarcopenia: causes, consequences, and preventions. *The journals of gerontology* 58: M911-916
- Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ (1998) Androgen receptors

- mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98: 256-261
- Martin RB, Boardman DL (1993) The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. *J Biomech* 26: 1047-1054
- Marzetti E, Leeuwenburgh C (2006) Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Experimental gerontology* 41: 1234-1238
- Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 9: 493-495
- Mazess RB, Barden HS, Bisek JP, Hanson J (1990) Dual-energy x-ray absorptiometry for total-body and regional bone-mineral and soft-tissue composition. *The American journal of clinical nutrition* 51: 1106-1112
- McArdle WD KF, Katch, VL. (1991) *Exercise Physiology: energy, nutrition and human performance*. 3 Ed Philadelphia: Lea and Febiger
- McArdle WD KF, Katch, VL. (2001) *Exercise Physiology: energy, nutrition and human performance*. 5 Ed Philadelphia: Lippincott 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 phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase alpha1 following overload in LKB1 knockout mice. *The Journal of physiology* 586: 1731-1741
- Mitchell PO, Pavlath GK (2004) Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. *American journal of physiology* 287: C1753-1762
- Mitsumori K, Terai A, Oka H, Segawa T, Ogura K, Yoshida O, Ogawa O (1999) Androgen receptor CAG repeat length polymorphism in benign prostatic hyperplasia (BPH): correlation with adenoma growth. *The Prostate* 41: 253-257
- Mizuno Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Kaneki M, Akeido Y, Nakamura T, Ouchi Y, Chang C, Orimo H (1994) Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcified tissue international* 54: 325-326
- Morel J, Combe B, Francisco J, Bernard J (2001) Bone mineral density of 704 amateur sportsmen involved in different physical activities. *Osteoporos Int* 12: 152-157
- 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 physiologica Scandinavica* 184: 3-15
- Nader GA (2005) Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37: 1985-1996
- Nader GA, Esser KA (2001) Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol* 90: 1936-1942
- Navarro D, Luzardo OP, Fernandez L, Chesa N, Diaz-Chico BN (2002) Transition to androgen-independence in prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 81: 191-201
- Naylor KEaE, R. (1999) Measurement of biochemical markers of bone formation. In: *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego, California: Academic Press: 401-410
- Nevitt MC (1994) Epidemiology of osteoporosis. *Rheumatic diseases clinics of North America* 20: 535-559
- Nicolas Diaz-Chico B, German Rodriguez F, Gonzalez A, Ramirez R, Bilbao C, Cabrera de Leon A, Aguirre Jaime A, Chirino R, Navarro D, Diaz-Chico JC (2007) Androgens and androgen receptors in breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 105: 1-15
- Nichols JF, Rauh MJ, Barrack MT, Barkai HS (2007) Bone mineral density in female high school athletes: interactions of menstrual function and type of mechanical loading. *Bone* 41: 371-377
- Nilsson LO, Boman A, Savendahl L, Grigelioniene G, Ohlsson C, Ritzen EM, Wroblewski J (1999) Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84: 370-373
- 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, Harman EA, Marx JO, Gotshalk LA, Frykman PN, Lammi E, Palmer C, Kraemer WJ (2000) Regional body composition changes in women after 6 months of periodized physical training. *J Appl Physiol* 88: 2251-2259
- 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
- Niyibizi C, Eyre DR (1994) Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem* 224: 943-950

- Olson TP, Dengel DR, Leon AS, Schmitz KH (2006) Moderate resistance training and vascular health in overweight women. *Medicine and science in sports and exercise* 38: 1558-1564
- Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A (2001) Collagen structure and functional implications. *Micron* 32: 251-260
- Pandini G, Mineo R, Frasca F, Roberts CT, Jr., Marcelli M, Vigneri R, Belfiore A (2005) Androgens up-regulate the insulin-like growth factor-I receptor in prostate cancer cells. *Cancer research* 65: 1849-1857
- 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
- Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, Burr DB, Atkinson S, Hsieh YF, Qiu J, Duncan RL (1998) Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *The American journal of physiology* 275: C1591-1601
- Pedersen BK (2007) Body mass index-independent effect of fitness and physical activity for all-cause mortality. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 17: 196-204
- Pederson L, Kremer M, Judd J, Pascoe D, Spelsberg TC, Riggs BL, Oursler MJ (1999) Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 505-510
- 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, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez JJ, Dorado C, Calbet JA (2008) Role of muscle mass on sprint performance: gender differences? *European journal of applied physiology* 102: 685-694
- Pilbeam CC, Raisz LG (1990) Effects of androgens on parathyroid hormone and interleukin-1-stimulated prostaglandin production in cultured neonatal mouse calvariae. *J Bone Miner Res* 5: 1183-1188
- Pincivero DM, Gandhi V, Timmons MK, Coelho AJ (2006) Quadriceps femoris electromyogram during concentric, isometric and eccentric phases of fatiguing dynamic knee extensions. *J Biomech* 39: 246-254
- Pivrotto LA, Cissel DS, Keeting PE (1995) Sex hormones mediate interleukin-1 beta production by human osteoblastic HOBIT cells. *Molecular and cellular endocrinology* 111: 67-74
- Piwien-Pilipuk G, Huo JS, Schwartz J (2002) Growth hormone signal transduction. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15: 771-786
- Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S (1987) Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *The Journal of clinical investigation* 80: 706-710
- Potvin JR (1997) Effects of muscle kinematics on surface EMG amplitude and frequency during fatiguing dynamic contractions. *J Appl Physiol* 82: 144-151
- Puustjarvi K, Nieminen J, Rasanen T, Hyttinen M, Helminen HJ, Kroger H, Huuskonen J, Alhava E, Kovanen V (1999) Do more highly organized collagen fibrils increase bone mechanical strength in loss of mineral density after one-year running training? *J Bone Miner Res* 14: 321-329
- Rajender S, Singh L, Thangaraj K (2007) Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian journal of andrology* 9: 147-179
- Raudrant D, Rabe T (2003) Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs* 63: 463-492
- Reeves ND, Narici MV, Maganaris CN (2006) Musculoskeletal adaptations to resistance training in old age. *Manual therapy* 11: 192-196
- Remes T, Vaisanen SB, Mahonen A, Huuskonen J, Kroger H, Jurvelin JS, Penttila IM, Rauramaa R (2003) Aerobic exercise and bone mineral density in middle-aged finnish men: a controlled randomized trial with reference to androgen receptor, aromatase, and estrogen receptor alpha gene polymorphisms small star, filled. *Bone* 32: 412-420
- Ren SG, Malozowski S, Sanchez P, Sweet DE, Loriaux DL, Cassorla F (1989) Direct administration of testosterone increases rat tibial epiphyseal growth plate width. *Acta endocrinologica* 121: 401-405
- Retornaz F, Paris F, Lumbroso S, Audran F, Tigoulet F, Michelon C, Jeandel C, Sultan C, Blain H (2006) Association between androgen receptor gene polymorphism and bone density in older women using hormone replacement therapy. *Maturitas* 55: 325-333
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine reviews* 23: 279-302
- Rodriguez-González G, Cabrera S, Ramírez-Moreno R, Bilbao C, Díaz-Chico JC, Serra L, Chesa N, Cabrera JJ, BN D-C (2008) Short alleles of both GGN and CAG repeats at the exon-1 of the androgen receptor gene are associated to increased PSA staining and a higher Gleason score in human prostatic cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol (In Press)*
- Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R, Falcon O, Jr., Diaz BP, Rivero JF, Perucho M, Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC (2006) Alleles with short CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *International journal of cancer* 118: 1420-1425
- 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. *Nature cell biology* 3: 1009-1013

- Roth SM, Ferrell RF, Hurley BF (2000) Strength training for the prevention and treatment of sarcopenia. *The journal of nutrition, health & aging* 4: 143-155
- Roth SM, Zmuda JM, Cauley JA, Shea PR, Ferrell RE (2004) Vitamin D receptor genotype is associated with fat-free mass and sarcopenia in elderly men. *The journals of gerontology* 59: 10-15
- Roubenoff R (2000) Sarcopenia: a major modifiable cause of frailty in the elderly. *The journal of nutrition, health & aging* 4: 140-142
- Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY, Chatterjee B (1999) Regulation of androgen action. *Vitamins and hormones* 55: 309-352
- Rubin C, Turner AS, Muller R, Mittra E, McLeod K, Lin W, Qin YX (2002) Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *J Bone Miner Res* 17: 349-357
- Rubin CT, Lanyon LE (1984) Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am* 66: 397-402
- Ryan AS, Ivey FM, Hurlbut DE, Martel GF, Lemmer JT, Sorkin JD, Metter EJ, Fleg JL, Hurley BF (2004) Regional bone mineral density after resistive training in young and older men and women. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 14: 16-23
- Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kroger H, Komulainen M, Pallonen H, Saarikoski S, Honkanen R, Maenpaa PH (2003) Relation of androgen receptor gene polymorphism to bone mineral density and fracture risk in early postmenopausal women during a 5-year randomized hormone replacement therapy trial. *J Bone Miner Res* 18: 319-324
- Saltin B, Calbet JA (2006) Point: in health and in a normoxic environment, VO₂ max is limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow. *J Appl Physiol* 100: 744-745
- Sartorelli V, Fulco M (2004) Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci STKE* 2004: re11
- Saxon LK, Lanyon LE (2008) Assessment of the in vivo adaptive response to mechanical loading. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 455: 307-322
- Schantz P, Randall-Fox E, Hutchison W, Tyden A, Astrand PO (1983) Muscle fibre type distribution, muscle cross-sectional area and maximal voluntary strength in humans. *Acta physiologica Scandinavica* 117: 219-226
- Schiaffino S, Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77: 493-501
- Schiaffino S, Reggiani C (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological reviews* 76: 371-423
- Schlicht J, Camaione DN, Owen SV (2001) Effect of intense strength training on standing balance, walking speed, and sit-to-stand performance in older adults. *The journals of gerontology* 56: M281-286
- Seeman E, Delmas PD (2006) Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *The New England journal of medicine* 354: 2250-2261
- Seeman E, Hopper JL, Young NR, Formica C, Goss P, Tsalamandris C (1996) Do genetic factors explain associations between muscle strength, lean mass, and bone density? A twin study. *The American journal of physiology* 270: E320-327
- 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
- Sheffield-Moore M (2000) Androgens and the control of skeletal muscle protein synthesis. *Annals of medicine* 32: 181-186
- Sherwood RI, Wagers AJ (2006) Harnessing the potential of myogenic satellite cells. *Trends in molecular medicine* 12: 189-192
- Silventoinen K, Magnusson PK, Tynelius P, Kaprio J, Rasmussen F (2008) Heritability of body size and muscle strength in young adulthood: a study of one million Swedish men. *Genetic epidemiology* 32: 341-349
- Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S (2002) Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E154-164
- 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
- Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE (1989) Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res* 4: 783-788
- Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston CC, Jr. (1991) Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 6: 561-567
- Slemenda CW, Longcope C, Zhou L, Hui SL, Peacock M, Johnston CC (1997) Sex steroids and bone mass in older men. Positive associations with serum estrogens and negative associations with androgens. *The Journal of clinical investigation* 100: 1755-1759
- Soroko SB, Barrett-Connor E, Edelstein SL, Kritz-Silverstein D (1994) Family history of osteoporosis and bone mineral density at the axial skeleton: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 9: 761-769

- Sowers M, Willing M, Burns T, Deschenes S, Hollis B, Crutchfield M, Jannausch M (1999) Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels. *J Bone Miner Res* 14: 1411-1419
- 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 medicine (Auckland, NZ)* 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, Karapondo DL, Kraemer WJ, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, Hagerman FC, Hikida RS (1994) Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J Appl Physiol* 76: 1247-1255
- Staron RS, Leonardi MJ, Karapondo DL, Malicky ES, Falkel JE, Hagerman FC, Hikida RS (1991) Strength and skeletal muscle adaptations in heavy-resistance-trained women after detraining and retraining. *J Appl Physiol* 70: 631-640
- 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
- Steinberg GR, Watt MJ, McGee SL, Chan S, Hargreaves M, Febbraio MA, Stapleton D, Kemp BE (2006) Reduced glycogen availability is associated with increased AMPK α 2 activity, nuclear AMPK α 2 protein abundance, and GLUT4 mRNA expression in contracting human skeletal muscle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 31: 302-312
- Stengel SV, Kemmler W, Pintag R, Beeskow C, Weineck J, Lauber D, Kalender WA, Engelke K (2005) Power training is more effective than strength training for maintaining bone mineral density in postmenopausal women. *J Appl Physiol* 99: 181-188
- Stiger F, Brandstrom H, Gillberg P, Melhus H, Wolk A, Michaelsson K, Kindmark A (2008) Association between repeat length of exon 1 CAG microsatellite in the androgen receptor and bone density in men is modulated by sex hormone levels. *Calcified tissue international* 82: 427-435
- Suda T, Takahashi N, Abe E (1992) Role of vitamin D in bone resorption. *Journal of cellular biochemistry* 49: 53-58
- Suominen H (2006) Muscle training for bone strength. *Aging clinical and experimental research* 18: 85-93
- 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 resistance-trained elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81: 421-425
- 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
- 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. *European journal of applied physiology* 102: 145-152
- Tofteng CL, Kindmark A, Brandstrom H, Abrahamsen B, Petersen S, Stiger F, Stilgren LS, Jensen JE, Vestergaard P, Langdahl BL, Mosekilde L (2004) Polymorphisms in the CYP19 and AR genes--relation to bone mass and longitudinal bone changes in postmenopausal women with or without hormone replacement therapy: The Danish Osteoporosis Prevention Study. *Calcified tissue international* 74: 25-34
- Toigo M, Boutellier U (2006) New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *European journal of applied physiology* 97: 643-663
- Tracy BL, Ivey FM, Hurlbut D, Martel GF, Lemmer JT, Siegel EL, Metter EJ, Fozard JL, Fleg JL, Hurley BF (1999) Muscle quality. II. Effects Of strength training in 65- to 75-yr-old men and women. *J Appl Physiol* 86: 195-201
- 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
- Trebbak JT, Wojtaszewski JF (2008) Role of 5'AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *International journal of obesity (2005)* 32 Suppl 4: S13-17
- van der Eerden BC, Gevers EF, Lowik CW, Karperien M, Wit JM (2002a) Expression of estrogen receptor alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. *Bone* 30: 478-485
- Van Der Eerden BC, Van De Ven J, Lowik CW, Wit JM, Karperien M (2002b) Sex steroid metabolism in the tibial growth plate of the rat. *Endocrinology* 143: 4048-4055
- Van Loan MD, Mayclin PL (1992) Body composition assessment: dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) compared to reference methods. *European journal of clinical nutrition* 46: 125-130
- Van Pottelbergh I, Lombroso S, Goemaere S, Sultan C, Kaufman JM (2001) Lack of influence of the androgen receptor gene CAG-repeat polymorphism on sex

- steroid status and bone metabolism in elderly men. *Clinical endocrinology* 55: 659-666
- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C (2004) Androgens and bone. *Endocrine reviews* 25: 389-425
- Vandewalle H, Peres G, Monod H (1987) Standard anaerobic exercise tests. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 4: 268-289
- 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
- Venturoli S, Marescalchi O, Colombo FM, Macrelli S, Ravaioli B, Bagnoli A, Paradisi R, Flamigni C (1999) A prospective randomized trial comparing low dose flutamide, finasteride, ketoconazole, and cyproterone acetate-estrogen regimens in the treatment of hirsutism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84: 1304-1310
- Vicente-Rodriguez G (2006) How does exercise affect bone development during growth? *Sports medicine (Auckland, NZ)* 36: 561-569
- Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Dorado C, Calbet JA (2005) Muscular development and physical activity as major determinants of femoral bone mass acquisition during growth. *British journal of sports medicine* 39: 611-616
- Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Serrano-Sanchez JA, Dorado C, Calbet JA (2004a) High femoral bone mineral density accretion in prepubertal soccer players. *Medicine and science in sports and exercise* 36: 1789-1795
- Vicente-Rodriguez G, Dorado C, Ara I, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Calbet JA (2007) Artistic versus rhythmic gymnastics: effects on bone and muscle mass in young girls. *International journal of sports medicine* 28: 386-393
- Vicente-Rodriguez G, Dorado C, Perez-Gomez J, Gonzalez-Henriquez JJ, Calbet JA (2004b) Enhanced bone mass and physical fitness in young female handball players. *Bone* 35: 1208-1215
- Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006) The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis Int* 17: 319-336
- Wagers AJ, Conboy IM (2005) Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* 122: 659-667
- Walsh S, Zmuda JM, Cauley JA, Shea PR, Metter EJ, Hurley BF, Ferrell RE, Roth SM (2005) Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J Appl Physiol* 98: 132-137
- Walts CT, Hanson ED, Delmonico MJ, Yao L, Wang MQ, Hurley BF (2008) Do sex or race differences influence strength training effects on muscle or fat? *Medicine and science in sports and exercise* 40: 669-676
- Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM (2001) The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res* 19: 1021-1026
- Ward R, Ross W, Leyland A, Selvie S (1989) The advanced O Scale Physique Assessment System.
- Weeks BK, Young CM, Beck BR (2008) Eight months of regular in-school jumping improves indices of bone strength in adolescent boys and Girls: the POWER PE study. *J Bone Miner Res* 23: 1002-1011
- Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, Hellstrand M, Landen M, Jansson M, Holm G, Bjorntorp P, Eriksson E (2001) Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86: 2562-2568
- Wilkinson SB, Tarnopolsky MA, Grant EJ, Correia CE, Phillips SM (2006) Hypertrophy with unilateral resistance exercise occurs without increases in endogenous anabolic hormone concentration. *European journal of applied physiology* 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. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association* 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
- Wiren K, Keenan E, Zhang X, Ramsey B, Orwoll E (1999) Homologous androgen receptor up-regulation in osteoblastic cells may be associated with enhanced functional androgen responsiveness. *Endocrinology* 140: 3114-3124
- Wiren KM, Zhang X, Chang C, Keenan E, Orwoll ES (1997) Transcriptional up-regulation of the human androgen receptor by androgen in bone cells. *Endocrinology* 138: 2291-2300
- Wittich A, Mautalen CA, Oliveri MB, Bagur A, Somoza F, Rotemberg E (1998) Professional football (soccer) players have a markedly greater skeletal mineral content, density and size than age- and BMI-matched controls. *Calcified tissue international* 63: 112-117
- Woodhouse LJ, Reisz-Porszasz S, Javanbakht M, Storer TW, Lee M, Zerounian H, Bhasin S (2003) Development of models to predict anabolic response to testosterone administration in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E1009-1017

- 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
- Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H (2005) Association of polymorphisms of the androgen receptor and klotho genes with bone mineral density in Japanese women. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83: 50-57
- Yaron M, Levy T, Chetrit A, Levavi H, Sabah G, Schneider D, Halperin R, Ben-Rafael Z, Friedman E (2001) The polymorphic CAG repeat in the androgen receptor gene in Jewish Israeli women with endometrial carcinoma. *Cancer* 92: 1190-1194
- Yu H, Bharaj B, Vassilikos EJ, Giai M, Diamandis EP (2000) Shorter CAG repeat length in the androgen receptor gene is associated with more aggressive forms of breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 59: 153-161
- Zachmann M, Ferrandez A, Murset G, Gnehm HE, Prader A (1976) Testosterone treatment of excessively tall boys. *The Journal of pediatrics* 88: 116-123
- Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *The Journal of cell biology* 166: 347-357

8. APÉNDICES – ESTUDIOS I-V

ESTUDIO I

Manuscript: SPO-S-08-00241 (Reviewed version)

EXERCISE AND BONE MASS IN ADULTS

Amelia Guadalupe-Grau, Teresa Fuentes, Borja Guerra, Jose A L Calbet.

Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain.

Running head: Bone mass and exercise.

Address Correspondence to: J.A.L. Calbet

Departamento de Educación Física

Campus Universitario de Tafira

35017 Las Palmas de Gran Canaria

Canary Islands

Spain

Fax: 34-928-458867

e-mail: lopezcalbet@gmail.com

1	Contents	
2	Abstract	3
3	Introduction	5
4	Experiments with animals.....	8
5	Studies with humans.....	10
6	Cross-sectional studies.....	10
7	Young men	11
8	Young women	13
9	Longitudinal studies	14
10	Young women	15
11	Young men	18
12	Pre-menopausal women	19
13	Middle-aged men	21
14	Aging	22
15	Postmenopausal women.....	23
16	Older men	28
17	Practical recommendations	29
18	Conclusions	30
19	References	34
20		

1 **Abstract**

2 There is a substantial body of evidence indicating that exercise prior to the pubertal growth
3 spurt stimulates bone growth and skeletal muscle hypertrophy to a greater degree than
4 observed during growth in non-physically active children. Bone mass can be increased by
5 some exercise programs in adults and the elderly, and attenuate the losses in bone mass
6 associated to ageing. This review provides an overview of cross-sectional and longitudinal
7 studies performed to date involving training and bone measurements. Cross-sectional studies
8 show in general that exercise modalities requiring high forces and/or generating high impacts
9 have the greatest osteogenic potential. Several training methods have been used to improve
10 bone mineral density and content in prospective studies. No all exercise modalities have
11 shown positive effects on bone mass. For example, unloaded exercise such as swimming has
12 no impact on bone mass, while walking or running has limited positive effects.

13 It is not clear which training method is superior for bone stimulation in adults,
14 although scientific evidence points to a combination of high impact (i.e. jumping) and weight
15 lifting exercises. Exercise involving high impacts, even a relatively small amount, appears to
16 be the most efficient for enhancing bone mass except in postmenopausal women. Several
17 types of resistance exercise have been tested also with positive results, especially when the
18 intensity of the exercise is high and the speed of movement elevated. A handful of other
19 studies have reported little or no effect on bone density. However, these results may be
20 partially attributable to the study design, intensity and duration of the exercise protocol, and
21 the bone density measurement techniques used. Studies performed in older adults show only
22 mild increases, maintenance or just attenuation of bone mineral density (BMD) losses in
23 postmenopausal women, but net changes in BMD relative to control subjects whom are losing
24 bone mass are beneficial in decreasing fracture risk. Older men have been less studied than
25 women, and although it seems that men may respond better than their female counterparts, the

1 experimental evidence for a gender dimorphism in the osteogenic response to exercise in
2 elders is weak. A randomised longitudinal study of the effects of exercise on bone mass in
3 elderly men and women is still lacking. It remains to be determined if elderly females need a
4 different exercise protocol compared to men of similar age. Impact and resistance exercise
5 should be advocated for the prevention of osteoporosis. For those with osteoporosis, weight-
6 bearing exercise in general, and resistance exercise in particular, as tolerated, along with
7 exercise targeted to improve balance, mobility and posture, should be recommended to reduce
8 the likelihood of falling and its associated morbidity and mortality. Additional randomised
9 controlled trials are needed to determine the most efficient training loads dependent on age,
10 gender, current bone mass and training history for improvement of bone mass.

1 **Introduction**

2 The most important function of bone tissue is to withstand and transmit forces without
3 breaking. The strength of bone depends on the amount of tissue, its material composition and
4 how bone material is organised microarchitecturally and geometrically (shape and size) [1, 2].
5 As summarised by Seeman and Delmas, optimal bone tissue characteristics are defined by
6 optimal levels of stiffness, flexibility and lightness [3]. To efficiently withstand and transmit
7 loads bone must be stiff and able to resist deformation. But they cannot be too stiff, i.e. unable
8 to absorb some energy by shortening and widening when compressed, and by lengthening and
9 narrowing when submitted to traction, otherwise the energy imposed during loading will be
10 released by structural failure. Conversely, bone can not be too flexible, because on loading
11 could easily deform beyond its peak strain and fracture [3]. Bone must also have the ability to
12 continually adapt to changes in physiologic and mechanical environment.

13 The mechanical properties of bone are determined by two major factors - the
14 characteristics of the collagen matrix and the degree of mineralisation, i.e. the amount of
15 calcium hydroxyapatite crystals deposited on and between the collagen fibers. Bone strength
16 is primarily determined by tissue mass and stiffness. While stiffness is mainly determined by
17 the mineral phase [4-7], the collagen matrix contributes primarily to bone toughness resilience
18 (i.e., the ability to absorb energy without breaking) [8-10]. Increasing bone mineral density
19 results in greater stiffness but lower flexibility [11].

20 Collagen, of which about 95% is type I collagen, comprises about 80% of the total
21 protein in bone [12]. Collagen fibers are packed together by the formation of inter- and
22 intramolecular crosslinks. Mature crosslinks such as pyridinoline (PYD) and
23 deoxypyridinoline (DPD) reach a maximum concentration between 15 and 40 years of age
24 and their concentrations are lower in trabecular bone than in cortical bone [13]. If there are
25 too many crosslinks the ability to absorb energy diminishes, i.e the bone becomes more

1 brittle. Likewise, without the collagen matrix the bone becomes less elastic and more brittle
2 [14]. In humans it has been shown that the compressive biomechanical ultimate strength of
3 bone was correlated, independently of BMD, with the ratio PYD/DPD, but not with PYD,
4 DPD, or pyrrole separately [15]. Non-fibrillar organic matrix acts as the 'glue' that holds the
5 mineralised fibrils together [16].

6 Bone strength also depends on the orientation of osteons (and thus collagen fibres)
7 within the cortical bone [17]. Longitudinal fibers are found in regions supporting tensile
8 loads, while transverse fibers predominate in regions under compressive loading [2, 18]. Part
9 of the bone plasticity in response to loading depends on its capacity to re-orient its collagen
10 fibers. For example, it has been reported in dogs that a 10% reduction in vertebral BMD
11 elicited by a strenuous progressive running program (up to 40 km/day) for one year did not
12 change the bone mechanical properties [19]. These dogs, compared to their sedentary
13 counterparts, showed reorganisation of the collagen fibers in a more parallel manner without
14 changes in the concentration of crosslinks, suggesting that collagen reorganization during
15 exercise may contribute to the maintenance of bone strength despite decreased mineral
16 density [19].

17 Bone mechanical properties are modified depending on loading, such that bone
18 strength is enhanced or reduced in response to either increased or reduced mechanical loading
19 [3, 20-22]. The adaptive response is very complex and depends on the characteristics of
20 loading history but also on systemic and local factors, which include neuroendocrine,
21 endocrine and paracrine changes in metabolites, cytokines, growth factors, hormones,
22 vitamins and minerals (for review see [23-27]). Excellent reviews have been published
23 recently on the molecular mechanisms that mediate adaptive responses of bone tissue to
24 changes in loading and the interested reader is referred to them [24-26, 28, 29]. The main
25 signals for bone adaptation to mechanical loading are the rate and magnitude of strain, which

1 should reach a minimal levels or threshold to elicit structural modifications in bone [30-33].
2 To enhance bone mass or bone mineral density in non-physically active humans bone tissue
3 must be submitted to mechanical strains above those experienced by daily living activities
4 [31, 34]. Although, experimental evidence indicates that mechanical loads must be great to
5 augment bone mass, to induce bone strains sufficient to cause microdamage and stimulate
6 bone formation through the repair of damaged tissue [35, 36], the intensity of loading is not
7 the only stimulus for bone accretion as demonstrated by Rubin et al [37, 38]. These authors
8 demonstrated that high frequency vibration (20-50 Hz) of very-low-magnitude (< 10
9 microstrain), continually present during even subtle activities such as standing, increases
10 trabecular bone mass in weight bearing regions of the skeleton in animals [37-39].

11 Mechanical loading triggers a cascade of cellular events that involve estrogen receptor
12 alpha (ER α) [26]. This may be the reason why the osteogenic effect of loading is greater when
13 the estrogen receptor number is high, as during adolescence, and less when the estrogen
14 receptor number is low, as occurs postmenopausally, during amenorrhea, or after ovariectomy
15 [26]. Signals from calcium channels, G-proteins, integrins and the cytoskeleton elicited by
16 mechanical loading convey in the activation of key intracellular enzymes leading to release of
17 nitric oxide, prostaglandin E₂, transforming growth factor β , insulin-like growth factor (IGF)-I
18 or IGF-II, ultimately leading to bone formation (for review see [28, 29]).

19 Osteoporosis is a reduction in bone mineral density (BMD) 2.5 standard deviations
20 below the mean for healthy young women at the age of attainment of peak bone mass
21 (expressed as a T score), usually using a reference population matched for age, sex and race
22 (expressed as a Z score) [40]. Loss of BMD contributes to loss of mechanical strength and to
23 bone fragility, and thus to predisposition for bone fractures, which may occur even under low
24 loading conditions as reviewed elsewhere [40-43]. This condition is a considerable
25 worldwide concern and a cause of high healthcare costs [44].

1 Although some risk factors for osteoporosis like genetics (sex, age, body size and
2 ethnicity) cannot be modified, it is possible to change variables like lifestyle and physical
3 activity to stimulate greater accumulation of peak bone mass [45]. Sports participation during
4 childhood and adolescence [46-50], especially before the pubertal growth spurt [51-58]
5 promotes bone mass accumulation, i.e. gain in total bone mineral content (BMC), and
6 geometrical changes in bone size and shape leading to a higher bone mass and stronger bones
7 in adult life [40, 56, 59, 60]. In fact, epidemiological studies indicate that bone size is related
8 to fracture risk when examined in relation to body size in children [61] and participation in
9 sports prior to puberty promotes bone hypertrophy, i.e. physically active pre-pubertal children
10 appear to develop bone of greater size than their sedentary peers, although this effect is
11 confined to the loaded regions [59, 62].

12 Although well documented reviews have been published in postmenopausal women
13 [3, 40, 42, 63], less is known about the effects that exercise programs and sports participation
14 may have on bone mass in adult young women at premenopausal age [64]. Thus, this article
15 focuses on the influence of physical activity BMC and BMD in pre and post menopausal
16 women and in men. In addition, we will review relevant studies in animals and humans,
17 highlighting variables like mode of exercise, intensity, duration, endocrine and metabolic
18 factors, and sex differences in the osteogenic response to training.

19

20 **Experiments with animals**

21 Using animal *in vivo* models in which mechanical loads have been specifically applied to the
22 rat tibia [65], rat tail [66], rat ulna [67], and avian-bone [37] it has been shown that the effects
23 of mechanical loading are dependent upon the magnitude, duration, and frequency of the
24 mechanical stimulus applied [68]. However, exercise not only consists of generation of

1 mechanical loads, it also perturbs acid-base balance, stimulates sympathetic activity and
2 influences production of several hormones, cytokines and adipokynes with known effects on
3 bone metabolism [69-73]. Thus, information provided by in vivo mechanical models should
4 be combined with the information gained with exercise models, bearing in mind that the
5 response to exercise may differ between animal species and that it is affected by other factors
6 such as age, gender, nutrition and genetics.

7 The use of animal models to study bone adaptation to exercise is based on the fact that
8 similar mechanisms control bone formation and resorption in animals and humans [74].
9 Experiments with rats have shown that running has osteogenic effects on loaded bones of
10 young male [75] and female [76, 77] rats, as well as in ovariectomized [78] and
11 orchidectomized rats [79], although the osteogenic effect of exercise appears to be less
12 efficient in female ovariectomized rats [78]. The forces generated during running play a role
13 in the osteogenic response since the rats that run with a loaded backpack on top of their back
14 show a greater gain in bone mass than the rats running without extra-load [80]. In contrast,
15 running at 80% of VO_2 max reduced longitudinal bone growth and induced bone loss mainly
16 due to decreased osteoblastic activity in 5-week old male rats [81] (Table 1). From these
17 studies, it can be concluded that treadmill running may be useful to increase bone mass in
18 young and adult rats of both genders, especially in appendicular long bones at weight bearing
19 sites; however, the increase in lumbar bone mass is absent or only detectable when long-term
20 exercise is applied [82]. However, these studies should be interpreted cautiously since rats do
21 not stop growing throughout their lifespan and, in contrast to what is observed in humans, in
22 adult rats longitudinal bone growth increases after ovariectomy, and oestrogen replacement
23 inhibits this growth [83].

24 In postpubertal female rats bone is less responsive to loading than in ovariectomized
25 rats or male rats of similar age [84]. Jarvinen et al. have raised the question about the

1 efficiency of bone loading during the oestrogen replete period in women, i.e. between puberty
2 and menopause [84]. Cross-sectional and observational longitudinal studies do indeed show a
3 higher responsiveness on human female bone to loading when regular exercise starts before
4 puberty than in the adult life [59, 60, 85].

5

6 **Studies with humans**

7 **Cross-sectional studies**

8 In this section, recent cross-sectional studies in adult women and men measuring bone mass
9 and/or BMD in recreational or professional athletes and sedentaries will be reviewed focusing
10 on the osteogenic response to training as well as gender differences in the osteogenic response
11 to training (Table 2). This issue has been previously reviewed by others (see [22, 86-89]) and
12 only some representative studies are commented in this section.

13 Inference from animal studies to humans [63] implies that strength training, instead of
14 endurance training programs such as running, should result in the greatest increase in skeletal
15 density. Focusing our attention on the early stage of life, girls and adolescents who spend
16 more time training than is proposed by physical activity curricula (less than 2 hours per week
17 in most European countries), achieve better peak bone mass, especially if they start before the
18 pubertal growth spurt [57, 58]. Cross-sectional studies including sports participation and
19 DXA (Dual-energy X-ray absorptiometry) measurement at prepubertal age show different
20 results depending on the intensity and rate of the strains elicited. High strain-eliciting sports
21 like gymnastics, which is thought to generate ground reaction forces close to 10 times body
22 mass in prepubertal children [90] report 5.7 % higher mean upper extremities BMD compared
23 with sedentaries in 9-years-old girls [49].

24 Weight-bearing physical activities also improve bone mass in prepubertals. In 9-year-
25 old-boys football (soccer) practice (3h per week) has been associated with increased BMD
26 compared to non-physically active boys at the lower limbs (LL) (\uparrow 4%), lumbar spine (SP)

1 (↑2%), and femoral neck (FN) (↑5%) [47, 51, 91]. Similarly, premenarcheal girls enrolled in
2 handball practice show enhanced BMC and BMD at the lumbar spine, pelvic region, and
3 lower extremities; they also show greater BMC in the whole body (WB) and enhanced BMD
4 in the right upper extremity and FN than the control subjects [48],

5 In these sports, the potential osteogenic forces acting on the appendicular and axial
6 bones are elicited by the high ground reaction forces evoked during jumping, kicking,
7 sprinting, rapidly changing direction, starting, stopping, throwing, fall landings and blocks
8 during defensive actions. Sports without the action of gravitational forces like swimming or
9 rowing are beneficial for physical fitness but do not appear to have osteogenic benefits [92,
10 93]. Swimmers, like astronauts [94], operate in a low-gravity environment, with minimal
11 impact on bone structures, and only relatively low tensions are transmitted by the muscular
12 system to the bones during this type of exercise. This could explain why exercising in water
13 early in life and regularly during the lifespan might abolish the osteogenic effect of sport.

14

15 Young men

16 Studies performed in our laboratory have reported that adult (19-27 years-old) amateur
17 male football (soccer) players with a long training history (mean time: 12 yrs) have increased
18 BMC and BMD at the lumbar spine (13% and 10% respectively), femoral neck (24% and
19 21%), and lower limbs (LL) (16% and 10%) compared with age-, height-, and weight-
20 matched sedentary controls of the same Caucasian population [95]. Similar results were
21 reported by Wittich et al. [96] in 20-22 years old football (soccer) players. These adaptations
22 are likely elicited by the ground reaction forces generated during jumping and sprinting with
23 sudden changes in the direction of movement, combined with the high strains elicited during
24 kicking [97, 98].

25 With relatively low volumes of exercise (2-3 h) per week is possible to elicit increases
26 in BMC and BMD in the loaded bones of prepubertal tennis players (Sanchis et al,

1 unpublished). The magnitude of the local adaptation elicited by tennis participation is further
2 enhanced for training volumes above 7 hours per week (Sanchis et al, unpublished). A direct
3 comparison of prepubertal football (soccer) players [51] or tennis players with professionals
4 adult players [95, 99] indicates that part of the in bone mass gained through sports
5 participation is achieved before puberty. In contrast, compared to sedentary peers, a 20%
6 lower lumbar spine bone mineral content has been reported in 19-56 year old long distance
7 runners performing a training volume close to 100 km/week [100].

8 Morel et al [92] examined the influence of regular exercise (mean: 9h/week) on BMD
9 in 403 non-professional male subjects aged 30 years-old involved in different sports. This is
10 an ideal age to compare BMD measurements because peak bone mass has been already
11 reached and bone loss is still insignificant. Soccer, basketball, volleyball, gymnastics,
12 weightlifting and ice hockey were associated with a higher whole body BMD (WBBMD)
13 whereas rowers and especially swimmers had a WBBMD similar to that of a sedentary group.
14 Regional BMD comparison suggested that there may be site-specific responses due to the
15 specific types of mechanical loading exerted through physical activity, because sportsmen
16 involved in impact-loading sports (i.e. fighting sports) had a higher leg BMD than those in
17 active loading sports (i.e. bodybuilding) (see table 2).

18 In the upper limbs the positive effect of mechanical loading via musculotendinous
19 attachments is demonstrated in racquet sports such as tennis [99, 101] and squash [102]. The
20 asymmetrical nature of racket sports offers an interesting model to study the adaptability of
21 both the skeletal and soft tissue of the upper limbs to physical stress, using the non-dominant
22 arm as a control. Based on a side-to-side comparison, these studies enabled elimination of the
23 confounding effects of genetic, hormonal, and nutritional factors that are encountered in
24 cross-sectional studies [101]. Elite young tennis players, (mean age 26 yrs), with a high
25 training load of 25h per week, show enhanced BMC (20%) and BMD (6%) in the dominant
26 arm compared with the contralateral arm. These tennis players had also increased (10-15%)

1 femoral neck and lumbar spine BMD compared with controls [99]. Similar effects have been
2 described in the mid-distal and third-distal radius in young adult male and female recreational
3 tennis players [103].

4

5 Young women

6 Second-division soccer female players (aged 18-24 years) show bone adaptations similar to
7 those reported in males [91], with 11, 15, 20% higher BMD at lumbar spine, femoral neck
8 and Ward's triangle, and 8-13% higher BMD at the non-dominant femur and humerus, distal
9 femur and proximal tibia compared with non physically active women (table 2).

10 Egan et al [104] compared BMD and body composition among young female athletes
11 (rugby players, distance runners and netball players) with a mean age of 21 years and
12 sedentary control subjects. All sports groups had higher BMD values than the controls, but
13 rugby players had the greatest BMD values at the lumbar spine ($\uparrow 16.5\%$), femoral neck
14 ($\uparrow 21.7\%$) and hip ($\uparrow 13.5\%$). Moreover, significant correlations between BMD and fat-free
15 soft tissue mass, BMD and body mass and BMD and training volume were observed.

16 Menstrual status has a major influence in the osteogenic response to exercise [88].
17 Cross-sectional data indicate that female oligo/amenorrheic high school athletes (mean age 16
18 years) practicing impact sports may not be accruing the same bone mass as their
19 eumenorrheic counterparts [105].

20 In summary, when normal menstrual status is reported in women, both genders seems
21 to benefit equally from sport participation (table 2), the mean gains for total body BMD are
22 about 10% reaching 15 to 20 % in the sport-specific loaded sites. According to the training
23 load and intensity, athletes which train more (20h per week approximately), achieve greater
24 bone mass gains. However, recreational athletes also benefit from 5-6h per week training
25 volume. If not accompanied by menstrual disturbances, high training volumes do not seem to
26 affect negatively the osteogenic adaptive response to loading. Most studies report that the

1 osteogenic response to exercise is specific to the loaded bones and sports with higher impact
2 and ground reaction forces elicit superior osteogenic responses. These effects are more
3 marked in athletes who began their sport participation close to the pubertal growth spurt.
4 Cross-sectional investigations are suggestive of a relationship between training and bone
5 metabolism; but, these studies compare independent samples and therefore are not able to
6 establish a causal relationship between the variables of interest. In fact part of the effects
7 described in the participants of different sports may have been caused by selection bias. Girls
8 or boys with a larger musculoskeletal size and bone mass [106], due to inherited
9 characteristics, may choose to exercise as they may be more likely to be successful in
10 competition and feel more rewarded by exercise practice. To rule out such a possibility
11 longitudinal studies and randomised clinical control trials are necessary.

12

13 **Longitudinal studies**

14 Although evidence is accumulating suggesting that childhood is the best period of life to
15 obtain osteogenic benefits from physical activity, modern children (especially girls), have
16 become increasingly sedentary [107, 108]. In addition, girls experience the pubertal growth
17 spurt 1-2 years before boys do [109] meaning that they should start regular activity even
18 sooner than boys to achieve the full osteogenic benefit from physical activity.

19 The strength of longitudinal studies is that randomised study designs reduce self-
20 selection in group assignment, which is particularly important in exercise trials where
21 individuals may be more or less predisposed to participate in physical activity. The majority
22 of these studies have been performed in women. There are few longitudinal studies testing the
23 response of males and females to the same training program. A review of recent longitudinal
24 studies performed with young adult males and females is depicted in Table 3.

25

1 *Young women*

2 Peak bone mass is thought to be attained by the end of the third decade of life, therefore, the
3 early adult years may be the final opportunity for its augmentation [110]. As summarised
4 previously in this review, athletes involved in high impact sports have higher bone mass than
5 other athletes, consequently, longitudinal exercise programs including exercises eliciting high
6 impacts and forces on bones should evoke greater accumulation of bone mass and
7 enhancement of BMD; however, the findings of studies performed in young adults have not
8 consistently produced these findings. Standard resistance-training protocols enhance muscle
9 mass [111-114] and in several cases bone mass [115, 116] in young women. Friedlander et al
10 [115] reported significant increases after a 2-year program of aerobics and weight training in
11 lumbar spine, intertrochanteric (IT) and calcaneal BMD. The addition of daily calcium
12 supplementation did not add significant benefit to the intervention [115]. Also, Snow-Harter
13 et al [117] noted significant increases in lumbar BMD in young women completing either a
14 progressive aerobic training program (jogging) or a progressive resistance training program,
15 when compared with a control group. The resistance training group showed significant
16 strength increases when compared with the aerobic trained women; however, the increases in
17 BMD were not significantly different between the two exercise groups. This result is
18 consistent with the site-specific principles of mechanical loading as both groups of women
19 performed weight-bearing exercise stressing the lower body and lumbar spine. Differences
20 might not necessarily be expected between exercise groups in these studies due to the short
21 duration of the protocol and the physiologic limits of bone formation and remodelling. These
22 conventional strength-training techniques involve both a concentric and an eccentric
23 component. However, maximal skeletal muscle eccentric contractions develop greater tension
24 than maximal concentric or isometric contractions [118], and the magnitude of the load
25 associated with maximal eccentric contraction is responsible for significant increases in bone

1 mass in young women [119]. Schroeder et al. [120] further investigated this topic by testing
2 the hypothesis that young women participating in high-intensity eccentric resistance training
3 would have significantly greater increases in lean body mass and muscle strength and
4 improved bone adaptations compared to low intensity eccentric resistance training. These
5 authors reported that low intensity eccentric training (75% of concentric 1RM) was as
6 effective as high intensity training (125% of a concentric 1RM) and surprisingly there were
7 no significant alterations in bone mass in the high intensity group [120]. This finding is at
8 odds with a previous study from this group reporting 3.9% greater BMD in the mid-femur
9 after a similar eccentric training protocol [119]. Eccentric training both at low and high
10 intensities has been associated with elevated concentrations of osteocalcin in conjunction with
11 decreased crosslinks, which suggests osteogenesis combined with reduced bone resorption
12 [120]. Nickols-Richardson et al [121] studied the effects of unilateral leg and arm high-
13 intensity strength training lasting 5 months in young women. One group underwent eccentric
14 training (ET) and other group underwent concentric training (CT) with non-trained limbs
15 serving as controls. The two kinds of exercise were similarly effective for improving
16 muscular strength and bone mass and density with gains in WBBMC (0.4% CT vs 0.6% ET),
17 proximal femur (PFBMD) (0.5% CT vs 1.2% ET), total forearm (TF) BMD (0.6% CT vs
18 0.4% ET), and TFBMC (0.4% CT vs 0.5% ET).

19 High impact training has also been demonstrated to yield positive results in young
20 women [122, 123]. Recently, Kato and coworkers [122, 123] tested the effect of a 6-month
21 low repetition jump training program (10 maximum vertical jumps/day, 3 times/week) on
22 lumbar and hip bone mineral density in young women (aged of 21 years). Despite the low
23 number of jumps compared to other studies based on jumping exercises in which subjects
24 performed 10 times more jumps per week [123], BMD increased significantly in both regions,
25 whereas no changes were observed in the control group. Although more studies are needed,

1 these results suggest that the bones of young women respond to low repetition as well as high
2 repetition jump training.

3 On the other hand, resistance training has been reported to have either no effect or a
4 negative impact on bone in a few studies in young women [124-126]. Sinaki et al [126] found
5 no significant effect of a three-year long non-strenuous, weight-lifting exercise program on
6 BMD at SP, WH or midradius in active but not athletic premenopausal women 30-40 years of
7 age. A particularity of this study is that only two different exercises were used: back extension
8 and shoulder girdle weight-lifting exercises (as defined by the authors). The back extension
9 exercise session consisted of three sets of 10 RM performed once a day for 3 days per week
10 (one supervised session each week at the medical center) with back extension. The shoulder
11 exercise program was adjusted every three month following sequence: 50% of 10 RM for the
12 first month, 75% of 10 RM for the second month, and 100% of 10 RM for the third month,
13 which was prior to the next visit and reevaluation [126].

14 Chilibeck et al. reported that after a 20-week weight-lifting training period which
15 increased muscle strength (23-73%) and lean tissue mass (3-10%) in the trunk and the
16 extremities fail to increase BMC and BMD in a whole body nor in arm, leg, ribs, thoracic and
17 lumbar spine, and pelvis segments, in 20 year old women [124]. Similarly, hip BMC and
18 BMD at femoral neck, trochanter, intertrochanter, and Ward's triangle sites, and total hip did
19 not increase with training [124]. In 28 year old women, no changes in whole body or regional
20 bone mass and density were observed following a 24-week training program combining
21 weight-lifting with endurance exercise (1.5 h/day for 5 days/wk), despite the fact that whole
22 body lean mass was increased by 2.2% and 5.5% increase in leg lean mass [125].,

23 To this point, the studies reviewed indicate that strength training needs to involve high
24 intensity exercises to enhance bone mass in young women. The osteogenic effect may be
25 attenuated if endurance exercise is carried out in combination with strength training and

1 enhanced if the strength training program is combined with high impact exercises, like
2 jumping.

3 Bone formation in weight-bearing regions of the skeleton can be stimulated by low-
4 magnitude high-frequency strains, induced through vibration [38, 39]. In young women with
5 low BMD, aged 15-20 years, low level whole body vibration (30Hz, 0.3g) applied daily
6 (between 2 and 10 min) during 1 year increased cancellous bone in the lumbar vertebrae
7 (2.1%) and cortical bone in the femoral midshaft (3.4%), respectively, measured by
8 Quantitative Computer Tomography (CT), compared with controls. It is noteworthy that, in
9 this study, these gains were not detected with DXA [127].

10

11 *Young men*

12 Randomised longitudinal studies on sedentary young men are scarce. A four month
13 strength training program (3 times per week, at 60-80% of 1RM) in Oriental men (aged 23-31
14 years) did not elicit changes in whole body or loaded bones BMC and BMD. However, serum
15 osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase concentrations were increased 1 month
16 after the start of the training, suggesting that bone markers are more efficient to detect
17 changes in the bone remodelling than DXA [128] . Hartman et al. [129] did not find
18 significant changes in WBBMC after 12-weeks of strength training (5 times-week) in subjects
19 that consumed fat-free milk, soy or carbohydrates after the training sessions despite
20 substantial increases in lean body mass and strength. However, a regional analysis of BMD
21 was not reported in that study. With six months of training (strength + aerobics) combined
22 with either protein or carbohydrate supplementation, positive effects on BMC, BMD and
23 geometrical variables of the tibia measured by peripheral quantitative computed tomography
24 (CT) have been reported in both young males and females [130]. In this study all groups

1 experienced significant increases in tibia cortical thickness and area, and decreased their
2 endosteal circumference over the intervention period. Cortical thickness among females was
3 greater if they were receiving supplemental protein, whereas among males the change was the
4 greatest if they were receiving carbohydrate supplementation. No changes were observed on
5 whole body measurements in any group. These results suggest that there may be sex specific
6 differences in the bone response to exercise when supplementing with protein. However, due
7 to the absence of a non-exercising control group it is not clear if exercise was the responsible
8 factor for the changes. This study contrasts with that of Ryan et al [131] who found no gender
9 differences in the training response between men and women for any of the whole body,
10 femoral neck, and lumbar spine BMD measurements after a 6-month resistance training
11 program. The latter study is also affected by the lack of age- and gender-matched control
12 groups.

13 We have not found long-duration (more than 6 months) randomised longitudinal
14 studies on the effects of strength training on bone mass in sedentary young males.

15

16 *Premenopausal women*

17 A long-term (18 month) randomised controlled prospective study with high intensity
18 resistance training in adult women indicated that regional BMD at the femoral neck and
19 trochanteric sites can be increased by resistance training exercise [132]. However, WBBMD
20 did not change significantly over the 18 months of this trial which could indicate that
21 increases in strength and lean tissue may be greater than increases in BMD in premenopausal
22 women and that in young women there may be a site-specific redistribution of bone mineral
23 density rather than a total body increase in BMC [132]. This hypothesis is supported in other
24 studies which evaluated regional body composition changes in women after periodized

1 physical training [112-114, 125, 133]. Similarly, Vainionpää et al. [134] noted significant
2 BMD increases in femoral and lumbar sites in premenopausal women after a progressive 12-
3 month high impact training (jumping) program; WB was not measured in this study but
4 calcaneal broadband ultrasound attenuation also showed a significant increase in the exercise
5 group compared with the control group [134], suggesting enhanced bone quality. Winters-
6 Stone et al [135] also support the site-specific response of lumbar spine and hip BMD to
7 upper and lower body resistance exercise training, in two groups of nonactive premenopausal
8 women (aged 33-44 years). They performed a high impact training program (lower limbs
9 group) or high impact and resistance training in the upper limbs (upper+lower group) for 12
10 months, and resulted in an increased greater trochanter BMD in both groups and lumbar spine
11 BMD only in upper+lower group.

12 A 18 month high impact training program (jumps+calisthenics) without concurrent
13 strength training has been reported to increase femoral neck BMD by 1.6% in women aged
14 35-45 yrs [136] .

15 In combination, these results indicate that targeted training could be effective in
16 women with low bone mass in an isolated bone site, a potentially inexpensive and safe way to
17 prevent and/or treat osteoporosis later in life. In a mixed population (21 men and 35 women;
18 age, 19-38 years), whole-body vibration, administered during 8 months (4 min/day, 3-5 times
19 per week), at 25 to 45 Hz, corresponding to estimated maximum vertical accelerations from 2
20 g to 8 g, had no effect on mass, structure, or estimated strength of bone at any skeletal site
21 [137]. Serum markers of bone turnover did not change during the vibration intervention [137].
22 These findings contrast with those Beck et al. who reported a 2% increase in BMD in the
23 proximal femur of five premenopausal women (18-45 years) submitted to whole-body
24 vibration (30 Hz, 2 x 10 min/day, 0.2-g stimulus) during 12 months [138]. This study,
25 however, must be interpreted cautiously because it lacked of control group and one of the
26 women was on treatment with biphosphonates [138]. Thus, it remains to be determined if

1 whole-body vibration alone or in combination with strength training could be an efficient
2 stimulus to enhance BMD in premenopausal women with either normal or reduced BMD at
3 the start of the program.

4

5 *Middle-aged men*

6 The effects of exercise on bone mass and structure in middle aged men are controversial.
7 Strength training (3 times per week at 5-15 RM) in 54-61 years aged men during 4 months
8 resulted in 2.0% gain in SP and 3.8% gain in femoral neck BMD after this period [139]. On
9 the other hand, regular aerobic (40-60% VO₂max) exercise in men (53-62 years) for a long
10 time (48 months) does not appear to have beneficial effects on the age-related loss of femoral
11 BMD, suggesting that starting regular aerobic exercise in middle age to prevent osteoporosis
12 in men may not be efficacious [140]. However, when during 6 months aerobic exercise was
13 combined with strength training WBBMD was maintained [141].

14 A unique study which involves both genders in the same exercise program shows that
15 6 months of moderate strength training (50% 1RM) and moderate aerobic training (60-90%
16 maximal heart rate) maintained WBBMD in males but decreased WBBMD in females [141].
17 Both genders experienced exercise-induced body weight and fat losses, suggesting that
18 although lean mass was increased after the training period (3%) the negative effect of losing
19 weight on BMD was stronger, although, the age-range of the participants was too wide [141].
20 Nevertheless, a lack of randomised controlled trials testing any kind of training and bone
21 measurements in middle aged men precludes any definitive conclusion on the effects of
22 exercise on bone mass in this segment of the population [142].

23

1 **Aging**

2 Some authors support the hypothesis that the magnitude of the peak skeletal mass in the first
3 three decades of life probably accounts for the variability in bone mass in elderly persons
4 [143] but it is currently impossible to prove or disprove this theory because there are no
5 studies with randomised controlled trials from puberty to old age that have investigated bone
6 fractures as an end point. These studies would require extremely large cohorts and a more
7 than 50 year study duration before the research question could be answered. Furthermore,
8 traits independent of BMD, such as skeletal architecture, bone size, balance, muscle strength
9 and neuromuscular proprioception, may also be affected by exercise, all of which could
10 influence the fracture risk and are not reviewed in this article [144, 145].

11 The Leisure World Study reports that women with an activity level of more than one
12 hour a day had a reduced risk of hip fracture, but the beneficial effect was lost if the activity
13 level was reduced [146]. In the Study of Osteoporotic Fracture (SOF), a longitudinal study
14 including 9704 women over 65 years of age and followed for about 8 years, women in the
15 highest quintile of current activity level had a 42% lower hip fracture risk than the least active
16 quintile of women, and self-reported walking time was associated with a 30% reduction in hip
17 fracture risk during a 4.1 year follow-up [43].

18 Studies evaluating the question of whether bone mass is maintained after a reduction
19 or cessation of exercise show contrasting results, irrespective of the level of BMD found in
20 retired athletes. To evaluate the hypothesis that exercise during growth reduces the clinical
21 problem of fragility fractures, it would be needed to demonstrate that retired athletes have
22 fewer fractures than controls. Wyshak et al [147] compared a large cohort of former female
23 college athletes with sedentary controls, aged 21-80 years. The number of former athletes
24 with fractures after retirement was no different than among the controls. Among women aged
25 60 years and over, who were fracture-free up to the age of 40, the rate of any fracture at age
26 40 or over was 29% for former athletes compared with 32% for nonathletes, a nonsignificant

1 difference. Nordström et al [41] measured BMD in two cohorts; the first was composed by 65
2 young male ice hockey players, 73 young soccer players (two high-impact sports) and 61 age-
3 matched controls. Measures were taken again after 5 years; at this moment 55 athletes had
4 retired from their active sports career. The second was composed of 400 former soccer and ice
5 hockey players and 800 age- and gender-matched controls. At baseline, all active groups had
6 higher BMD values at whole body, femoral neck, lumbar spine and arms compared with
7 controls; after 5 years the young retired athletes still had a 4-8% higher BMD than controls
8 whereas young athletes increased the difference in BMD compared with the controls at
9 femoral neck and arms. These results suggest that higher BMD persists until several decades
10 after retirement. Furthermore, retired athletes had fewer fractures than controls. Therefore it
11 seems that exercise during childhood and adolescence may be associated with lower risk of
12 sustaining fragility fractures during old age in men [86], but in women these beneficial results
13 only persist if exercise practice is maintained.

14 The effects of exercise protocols on bone density have also been reported in older
15 populations, a review of recent longitudinal studies is provided in Table 4 and 5 for females
16 and males respectively.

17

18 *Postmenopausal women*

19 Nelson et al [148] completed a 1-year randomised controlled trial of high-intensity
20 resistance training in postmenopausal women. The results of the study demonstrated that
21 women in a 2 d·wk⁻¹ resistance training program gained an average of 1% in BMD of the
22 femoral neck and lumbar spine whereas the control group lost 2.5% and 1.8% at these sites,
23 respectively. In addition, the resistance-trained women tended to maintain WBBMC of the
24 skeleton whereas the women in the control group had a 1.2% decline in WBBMC. Also, the
25 resistance-trained women had 35-76% increase strength, 14% improvement in dynamic

1 balance, and a 1.2-kg increase in total body lean mass and a 27% increase in physical activity
2 unrelated to the intervention whereas the control group showed declines in all of these
3 parameters. In agreement with these results, Kerr et al [149] reported that postmenopausal
4 bone mass can be significantly increased by a strength regimen that uses high loads and low
5 number of repetitions (3 x 8RM) but not by an endurance regimen that uses low loads and
6 high number of repetitions (3 x 20RM). In 1-7 years postmenopausal women, following 9
7 month of strength training with intermediate loads (2x10-15RM) lumbar spine BMD was
8 enhanced by 1.6%. In this study each subject performed one set of 10-12RM (increasing
9 progressively) for upper body training and one set of 10-15RM for lower body training. In
10 contrast the women from the control group experienced a 3.6 % decline in lumbar spine BMD
11 [150]. Altogether, these studies show that the peak load is more important than the number of
12 loading cycles in increasing bone mass in postmenopausal women.

13 In late postmenopausal women (aged 60 to 72 years), 9 months of endurance (mostly
14 running at 60-70% of VO_2 max, 3-4 times a week, during 35-50 min per session) training
15 either alone or in combination with hormone replacement therapy (HRT) resulted in
16 significant increases in lumbar spine and femoral neck [151]. Exercise and HRT resulted in
17 independent and additive effects on the BMD of the lumbar spine and Ward's triangle and a
18 synergistic effect on whole body BMD. This effects were accompanied by a reduction in
19 serum osteocalcin levels, indicating that increases in BMD in response to HRT and exercise +
20 HRT were due to decreased bone turnover [151]. The lack of change in serum osteocalcin and
21 IGF-I in response to exercise alone suggests that the increases in BMD were due to decreased
22 bone resorption and not increased formation [151].

23 Other studies have just reported the maintenance of BMD in postmenopausal women
24 with resistance training [152, 153]. There is evidence that postmenopausal women respond
25 differently to a resistance training program than premenopausal women [154, 155]. Bassey et

1 al. [154] studied the effects of a vertical jumping exercise regime on bone mineral density
2 (BMD) using randomized controlled trials in both pre- and postmenopausal women, the latter
3 stratified for HRT. The exercise consisted of 50 vertical jumps on 6 days/week of mean height
4 8.5 cm, which produced mean ground reactions of 3.0 times body weight in the young women
5 and 4.0 times in the older women. In the premenopausal women, the exercise resulted in a
6 significant increase of 2.8% in femoral BMD after 5 months. In the postmenopausal women,
7 there was no significant difference between the exercise and control groups after 12 months
8 (total n = 123) nor after 18 months (total n = 38). HRT status did not affect this outcome, at
9 least up to 12 months. Sugiyama et al. [155] studied a group of Japanese female volunteers
10 around 50 years of age divided into premenopausal women with a regular menstruation cycle
11 and postmenopausal women within 5 years since menopause. About half of the subjects in
12 each group chose to be non-exercisers. The remainder followed a 6 months training program
13 which consisted of rope skipping (100 jumps/day, with an interval of 2–3 days). In total, 10
14 days per month and 60 days during the study period. Among the premenopausal women, the
15 BMD in the exercise group increased significantly in comparison to the control for total hip
16 (+1.6%) and femoral neck (2.4%), but changes at the whole body and lumbar spine levels
17 were not significant. In contrast, there were no significant differences at any measurement
18 sites among the postmenopausal women. Interestingly, in the premenopausal exercise group,
19 the baseline value of urinary γ -carboxyglutamate (Gla) residues (an indirect measure of
20 osteocalcin carboxylation) was inversely correlated ($r=-0.62$) with the change in whole body
21 BMD. The latter could indicate that bone gain induced by high impact exercise could become
22 greater in proportion to the degree of deterioration in bone material properties [155].

23 Therefore, although optimum training strategies are still under discussion, it is
24 generally acknowledged that the training should be population specific. Stengel et al [153]
25 tested the hypothesis that power training was more effective than conventional strength

1 training for maintaining BMD at lumbar spine and hip. Forty two postmenopausal women
2 performed a 12-month training program; the only difference between the two groups was the
3 velocity at which movements were performed. The training protocol specified a 4s concentric,
4 4s eccentric sequence in the resistance training group, and a concentric fast/explosive, 4s
5 eccentric sequence in the power training group. In addition, all women performed gymnastics
6 and home training sessions. Women involved in power training group maintained their BMD
7 at lumbar spine and hip; whereas resistance training women experienced a significant
8 decrease in lumbar spine and hip sites from baseline. These results indicate that to elicit a
9 osteogenic response in older women the strains and ground reaction forces required may be
10 higher than those able to elicit a similar or even greater response in younger women.

11 Palombaro [156] reviewed the effects of walking-only programs on bone mineral
12 density at various skeletal sites. This meta-analysis showed that walking interventions alone
13 did not attenuate bone loss at the skeletal sites reported. Thus, other forms of exercise in
14 addition to walking should be incorporated into training regimens for patients at risk for
15 osteoporosis. Supporting this notion Chien et al [157] examined the efficacy of a 24-week
16 aerobic plus high exercise program for osteopaenic postmenopausal women, and this
17 appeared to be effective in offsetting the age-related decline of BMD, especially at the
18 femoral neck which showed a significant improvement of 6.8% in the exercise group.

19 Kohrt et al [158], applied two different training protocols to postmenopausal women at
20 risk of osteoporosis. The first protocol consisted of exercises that stimulated the skeleton
21 through ground-reaction forces (walking, jogging, stair climbing) while the second protocol
22 included activities eliciting joint-reaction forces (weight lifting, rowing). The intensity was
23 initially set at a low level (60% maximal heart rate (MHR), 12RM) and progressed with
24 training to (85%MHR, 8RM). After 11 months, BMD was increased at the whole body level
25 and femoral neck in both groups, but the effects were greater in the ground reaction than the

1 joint-reaction group [158]. These results could be explained by the combination of walking,
2 jogging and stair climbing, which may generate ground reaction forces between 2.8-6 times
3 body weight [159] in the ground reaction group, and the use of free weights in the resistance
4 training combined with rowing in the joint reaction group. However, more randomised,
5 controlled studies testing aerobic plus high-impact training in older adults are needed.

6 Whole body vibration training in postmenopausal women has been shown to increase
7 femoral neck BMD and balance more than walking [160]. Compared to resistance exercises
8 progressing from low (20RM) to high (8RM) loading conditions, 6 months of static and
9 dynamic knee extensor exercises on a vibration platform (35-40 Hz, 2.28-5.09g) enhanced hip
10 BMD by 0.9% [161]. In another study whole body vibration inhibited bone loss in the spine
11 and femur of postmenopausal women [162]. These authors performed a 1-year prospective,
12 randomized, double-blind, and placebo-controlled trial of 70 postmenopausal women who
13 undertake brief periods (<20 minutes) of a low-level (0.2g, 30 Hz) vibration applied during
14 quiet standing. The efficacy of this intervention was enhanced in the women with
15 significantly with greater compliance, particularly in those subjects with lower body mass
16 [162].

17 The studies on postmenopausal women indicate show that BMD can be increased or at
18 least the decline in bone mass during the menopause attenuated weight training exercises. The
19 osteogenic effects are site-specific and can only be achieved with high loading intensities
20 (above 70% of 1RM) with 3-4 sessions per week and 2-3 sets [163]. Although significant
21 effects can be observed after 4-6 month in some locations, the efficacy of the training
22 program is greater when extended for one year or more. Combining strength training with
23 aerobic exercise may also result in positive effects on BMD. Whole body vibration alone or in
24 combination with exercise may help to increase or at least prevent BMD decline with ageing
25 in postmenopausal women. However, the gains in bone density and neuromuscular functions
26 achieved by training are lost five years after cessation of training [164]. Continuous high-

1 intensity weight-loading physical activity is probably necessary to preserve bone density and
2 neuromuscular function in older women.

3

4 *Older men*

5 Older men have been much less studied than older women, possibly because of the
6 lower osteoporotic fractures incidence in men [165]. One of these studies compared the
7 effects of either a moderate (three sets of 10–13 repetitions at 40–60% of 1 RM) or high
8 intensity (three sets of 2-10 repetitions at 70-90% of 1 RM) resistance training program (with
9 exercises involving all major muscle groups) in men and women aged 50-60 years [166].
10 Both older men and women achieved significant increases in muscular strength and muscle
11 mass regardless of intensity or training protocol [166]. The high intensity training men
12 experienced a significant increase in lumbar spine and greater trochanter BMD; however,
13 women training with high intensity only increased greater trochanter BMD slightly, maybe
14 because these women were primarily early postmenopausal (within 36 months), a time during
15 which there is accelerated bone loss of 2-6.5% per year. High intensity free weight training
16 was tolerated well by older adults and produced BMD changes in only 6 months. In older
17 men, high intensity training was more osteogenic at the lumbar spine than moderate intensity
18 training. In agreement with Maddalozzo et al. [166], Stewart et al. [141] reported no effect on
19 BMD in men (55 to 75 year old) following a six months of multistation machine at 50% of
20 1RM followed by 45 minutes of aerobic training at 60-90 % of their maximal heart rate.
21 Nevertheless, in this training program resulted in other positive effects like gains in lean mass,
22 reduced fat mass, and improved aerobic capacity [166].

23 Bone mass improvement has been observed in older men (mean aged of 61 years) after
24 a relatively short training period [167]. In this study, femoral neck BMD was enhanced by
25 2.8% following 3 month of high intensity training (5RM; 3 times per week) [167]. These

1 results could be conflicting, because Frost [168] has argued that short-term increases in BMD
2 measured by photon absorptiometry may reflect transient increases.

3 In general, 1-3% BMD improvement in loaded bones can be achieved in old men with
4 six month of strength training using heavy loads (above 70% of 1RM, 3 times per week),
5 while loads below 60% of 1 RM are unlikely to have a positive influence on bone mass [169].

6

7 **Practical recommendations**

8 Any prescription of exercise aiming at improving bone mass must take into consideration the
9 following factors:

10 (i) Age and gender of the subjects. At prepubertal and young adult ages gender differences are
11 not so important, but at middle and older age, evidence from the literature suggest that women
12 have to train at higher intensities than men to improve their bone mass, always keeping a
13 security range to avoid injuries.

14 (ii) Choice and order of the exercises. Since bone adaptation is limited to loaded regions,
15 exercise must be chosen to specifically act on the clinically relevant sites, i.e., lumbar and
16 thoracic spine, whole hip, and especially greater trochanter, intertrochanteric and femoral
17 neck regions. The easiest and safest way to load these regions is by using weightlifting
18 exercises like: leg press, leg extension, leg curl, squats, loaded back extensions, and some
19 shoulder and arm exercises. If not contraindicated, the training program should include impact
20 exercises, like jumping, jogging, stair climbing, sprinting. Impact exercises must be increased
21 progressively to the maximal effort possible according to the subject's specific possibilities.
22 The kind of impact exercise included in the program must be appropriate for the age of the
23 participants, trying to keep the risk of fall as low as possible in the elders. It must be taken
24 into consideration that the osteogenic potential of jumping exercise is reduced in
25 postmenopausal women, but postmenopausal women may respond well to strength training.

1 (iii) Intensity. To enhance bone mass the threshold intensity must be reached. This level has
2 not been unequivocally established and may vary from subject to subject, being likely lower
3 for subjects with already reduced bone mass. Most strength training programs showing
4 positive effects on bone mass have used intensities between 70-90% 1RM, always following
5 an appropriate progression from lower to higher intensities.

6 (iv) Frequency. Most studies with positive results have used 2-3 training days per week.
7 However, good responses to jumping exercise sessions with frequencies up to 6 days per
8 week have also been reported. Weight-bearing endurance exercise (30-60 minutes) can be
9 carried out 3-5 times, or even on a daily basis depending on training experience and tolerance

10 (v) Volume. In weightlifting programs, the major muscle groups of the upper and lower
11 extremities must be trained in balance way, without creating imbalance between agonist and
12 antagonist. The number of repetitions per exercise must be close to maximal that can be
13 performed with a given load and 2-3 sets should be completed, with 1-3 minutes resting
14 periods in between. In regard with high impact training there is no consensus in the literature
15 on how many jumps must be performed but depending on the subjects tolerance, 50-100
16 jumps should be carried out each training day. Strength training combined with high impact
17 exercise could have additive effects in some subjects.

18 (vi) Movement velocity. Although a progression from medium to high speed of movement is
19 advocated at the start of the training program, as soon as subjects are able to carried out the
20 exercise safely, i.e., with proper biomechanical execution, movements must be performed
21 focusing on achieving the maximal execution speed possible. Explosive muscle contractions
22 are expected to elicit a greater osteogenic stimulus [153].

23

24 **Conclusions**

25 The research completed to date indicates that participation in high impact sports, especially
26 prior to puberty, is important for maximising bone mass accumulation and achieving a greater

1 peak bone mass independent of gender. The effects of loading appear to be limited to the
2 loaded bones. Starting the exercise before puberty has an additional benefit, since exercise
3 elicits geometrical changes in bone which in turn enhance mechanical competence.
4 Continuing sport practice is associated with fewer bone fragility fractures in old age in both
5 men and women,

6 Several training methods have been used to improve bone mineral density and content
7 in prospective studies. Not all exercise modalities have positive effects on bone mass. For
8 example, unloaded exercise, like swimming and cycling has no impact on bone mass, while
9 walking or running has limited positive effects.

10 It is not clear which is the best training method for enhancing bone mass, although
11 scientific evidence points to a combination of high impact exercises (i.e. jumping) with
12 weight lifting exercises. High impact exercise, even a limited amount, appears to be the most
13 efficient to enhance bone mass except in postmenopausal women. Several types of resistance
14 exercise have been tested with positive results when the intensity of the exercise is high and
15 the speed of movement elevated. Resistance training is positively associated with high BMD
16 in both young people and adults and the effect of resistive exercise is relatively site-specific to
17 the working muscles and the bones to which they attach, however more studies are needed to
18 establish whether gender differences in the bone response to training exist. Although aerobic
19 exercise and weight bearing physical activity are important in maintaining overall health and
20 healthy bones, resistance exercise has been shown to have a more potent effect on bone
21 density. Studies performed in older adults show a gender discrepancy. Older men respond
22 better to osteogenic training protocols than their female counterparts, although randomised
23 longitudinal studies on the effects of exercise on bone mass in the elderly are still lacking. Old
24 women only show mild increases or just a maintenance or attenuation of BMD losses. It
25 remains to be determined if old women need a different exercise protocol compared to men of
26 similar age.

1 Impact and resistance exercise should be advocated for the prevention of osteoporosis.
2 For those with osteoporosis, weight-bearing exercise in general, and resistance exercise in
3 particular, as tolerated, along with exercise targeted to improve balance, mobility and posture,
4 should be recommended to reduce the likelihood of falling and its associated morbidity and
5 mortality

6 There is certainly a need for additional randomised controlled trials in this research
7 area, which will allow development of criteria for appropriate training loads according to age,
8 gender, actual bone mass and past training history.

1 **ACNOWLEDGEMENTS**

2 The study was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56076-C06-
3 04/ACTI). Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias (2006/179
4 0001 and FEDER). Borja Guerra is a fellow of the “Recursos Humanos y Difusión de la
5 Investigación” Programe (ISCIII, MSC, Spain). The authors thank José Navarro de Tuero for
6 his excellent technical assistance. The specialised advice from Tony Webster in editing the
7 English version of the manuscript is also acknowledged. The author has no conflicts of
8 interest that are directly relevant to the content of this review.

References

1. Bouxsein ML, Karasik D. Bone geometry and skeletal fragility. *Curr Osteoporos Rep* 2006; 4(2): 49-56.
2. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 2006; 17(3): 319-36.
3. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006; 354(21): 2250-61.
4. Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. *Micron* 2001; 32(3): 251-60.
5. Currey JD. Changes in the impact energy absorption of bone with age. *J Biomech* 1979; 12(6): 459-69.
6. Currey JD. The effect of porosity and mineral content on the Young's modulus of elasticity of compact bone. *J Biomech* 1988; 21(2): 131-9.
7. Currey JD, Brear K, Zioupos P. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *J Biomech* 1996; 29(2): 257-60.
8. Bailey AJ, Wotton SF, Sims TJ, Thompson PW. Post-translational modifications in the collagen of human osteoporotic femoral head. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185(3): 801-5.
9. Boskey AL, Wright TM, Blank RD. Collagen and bone strength. *J Bone Miner Res* 1999; 14(3): 330-5.
10. Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res* 2001; 19(6): 1021-6.
11. Currey JD. The mechanical consequences of variation in the mineral content of bone. *J Biomech* 1969; 2(1): 1-11.
12. Niyibizi C, Eyre DR. Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur J Biochem* 1994; 224(3): 943-50.
13. Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J* 1988; 252(2): 495-500.
14. Fantner GE, Birkedal H, Kindt JH, Hassenkam T, Weaver JC, Cutroni JA, et al. Influence of the degradation of the organic matrix on the microscopic fracture behavior of trabecular bone. *Bone* 2004; 35(5): 1013-22.
15. Banse X, Sims TJ, Bailey AJ. Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res* 2002; 17(9): 1621-8.

16. Fantner GE, Hassenkam T, Kindt JH, Weaver JC, Birkedal H, Pechenik L, et al. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat Mater* 2005; 4(8): 612-6.
17. Hert J, Fiala P, Petrtyl M. Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man. *Bone* 1994; 15(3): 269-77.
18. Martin RB, Boardman DL. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. *J Biomech* 1993; 26(9): 1047-54.
19. Puustjarvi K, Nieminen J, Rasanen T, Hyttinen M, Helminen HJ, Kroger H, et al. Do more highly organized collagen fibrils increase bone mechanical strength in loss of mineral density after one-year running training? *J Bone Miner Res* 1999; 14(3): 321-9.
20. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003; 423(6937): 349-55.
21. Pavy-Le Traon A, Heer M, Narici MV, Rittweger J, Vernikos J. From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). *Eur J Appl Physiol* 2007; 101(2): 143-94.
22. Chilibeck PD, Sale DG, Webber CE. Exercise and bone mineral density. *Sports Med* 1995; 19(2): 103-22.
23. Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 275(2): 1081-101.
24. Rittweger J. What is new in neuro-musculoskeletal interactions: mechanotransduction, microdamage and repair? *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2007; 7(2): 191-3.
25. Rosen CJ. Bone remodeling, energy metabolism, and the molecular clock. *Cell Metab* 2008; 7(1): 7-10.
26. Lee KC, Lanyon LE. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. *Exerc Sport Sci Rev* 2004; 32(2): 64-8.
27. Skerry TM. One mechanostat or many? Modifications of the site-specific response of bone to mechanical loading by nature and nurture. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2006; 6(2): 122-7.
28. Scott A, Khan KM, Duronio V, Hart DA. Mechanotransduction in human bone: in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. *Sports Med* 2008; 38(2): 139-60.
29. Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene* 2006; 367: 1-16.
30. Saxon LK, Lanyon LE. Assessment of the in vivo adaptive response to mechanical loading. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 2008; 455: 307-22.
31. Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec* 1987; 219(1): 1-9.

32. Frost HM. Wolff's law: an 'MGS' derivation of Gamma in the Three-Way Rule for mechanically controlled lamellar bone modeling drifts. *Bone and mineral* 1993; 22(2): 117-27.
33. Bailey CA, Brooke-Wavell K. Exercise for optimising peak bone mass in women. *Proc Nutr Soc* 2008; 67(1): 9-18.
34. Shaw J. Exercise for skeletal health and osteoporosis prevention. *ACSM's resource manual for guidelines for exercise testing and prescription* 1998: p. 288-93.
35. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the bone modeling problem. *Anat Rec* 1990; 226(4): 403-13.
36. Burr DB, Forwood MR, Fyhrie DP, Martin RB, Schaffler MB, Turner CH. Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J Bone Miner Res* 1997; 12(1): 6-15.
37. Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am* 1984; 66(3): 397-402.
38. Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K. Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 2001; 412(6847): 603-4.
39. Rubin C, Turner AS, Muller R, Mittra E, McLeod K, Lin W, et al. Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *J Bone Miner Res* 2002; 17(2): 349-57.
40. Borer KT. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. *Sports Med* 2005; 35(9): 779-830.
41. Nordstrom A, Karlsson C, Nyquist F, Olsson T, Nordstrom P, Karlsson M. Bone loss and fracture risk after reduced physical activity. *J Bone Miner Res* 2005; 20(2): 202-7.
42. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994; 843: 1-129.
43. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 1995; 332(12): 767-73.
44. Kanis JA, Melton LJ, 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994; 9(8): 1137-41.
45. Mein AL, Briffa NK, Dhaliwal SS, Price RI. Lifestyle influences on 9-year changes in BMD in young women. *J Bone Miner Res* 2004; 19(7): 1092-8.
46. Vicente-Rodriguez G. How does exercise affect bone development during growth? *Sports Med* 2006; 36(7): 561-9.

47. Vicente-Rodriguez G, Jimenez-Ramirez J, Ara I, Serrano-Sanchez JA, Dorado C, Calbet JA. Enhanced bone mass and physical fitness in prepubescent footballers. *Bone* 2003; 33(5): 853-9.
48. Vicente-Rodriguez G, Dorado C, Perez-Gomez J, Gonzalez-Henriquez JJ, Calbet JA. Enhanced bone mass and physical fitness in young female handball players. *Bone* 2004; 35(5): 1208-15.
49. Vicente-Rodriguez G, Dorado C, Ara I, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, et al. Artistic versus rhythmic gymnastics: effects on bone and muscle mass in young girls. *Int J Sports Med* 2007; 28(5): 386-93.
50. McVeigh JA, Norris SA, Pettifor JM. Bone mass accretion rates in pre- and early-pubertal South African black and white children in relation to habitual physical activity and dietary calcium intakes. *Acta Paediatr* 2007; 96(6): 874-80.
51. Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Serrano-Sanchez JA, Dorado C, Calbet JA. High femoral bone mineral density accretion in prepubertal soccer players. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36(10): 1789-95.
52. Wang Q, Alen M, Nicholson P, Suominen H, Koistinen A, Kroger H, et al. Weight-bearing, muscle loading and bone mineral accrual in pubertal girls--a 2-year longitudinal study. *Bone* 2007; 40(5): 1196-202.
53. Bradney M, Pearce G, Naughton G, Sullivan C, Bass S, Beck T, et al. Moderate exercise during growth in prepubertal boys: changes in bone mass, size, volumetric density, and bone strength: a controlled prospective study. *J Bone Miner Res* 1998; 13(12): 1814-21.
54. Bass SL. The prepubertal years: a uniquely opportune stage of growth when the skeleton is most responsive to exercise? *Sports Med* 2000; 30(2): 73-8.
55. Bailey DA, McKay HA, Mirwald RL, Crocker PR, Faulkner RA. A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in growing children: the university of Saskatchewan bone mineral accrual study. *J Bone Miner Res* 1999; 14(10): 1672-9.
56. Greene DA, Naughton GA. Adaptive skeletal responses to mechanical loading during adolescence. *Sports Med* 2006; 36(9): 723-32.
57. Bass SL, Saxon L, Daly RM, Turner CH, Robling AG, Seeman E, et al. The effect of mechanical loading on the size and shape of bone in pre-, peri-, and postpubertal girls: a study in tennis players. *J Bone Miner Res* 2002; 17(12): 2274-80.
58. Seeman E. An exercise in geometry. *J Bone Miner Res* 2002; 17(3): 373-80.
59. Kannus P, Haapasalo H, Sankelo M, Sievanen H, Pasanen M, Heinonen A, et al. Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann Intern Med* 1995; 123(1): 27-31.
60. Heinonen A, Sievanen H, Kannus P, Oja P, Pasanen M, Vuori I. High-impact exercise and bones of growing girls: a 9-month controlled trial. *Osteoporos Int* 2000; 11(12): 1010-7.

61. Manias K, McCabe D, Bishop N. Fractures and recurrent fractures in children; varying effects of environmental factors as well as bone size and mass. *Bone* 2006; 39(3): 652-7.
62. Laing EM, Wilson AR, Modlesky CM, O'Connor PJ, Hall DB, Lewis RD. Initial years of recreational artistic gymnastics training improves lumbar spine bone mineral accrual in 4- to 8-year-old females. *J Bone Miner Res* 2005; 20(3): 509-19.
63. Lanyon LE. Using functional loading to influence bone mass and architecture: objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptive process in bone. *Bone* 1996; 18(1 Suppl): 37S-43S.
64. Martyn-St James M, Carroll S. Progressive high-intensity resistance training and bone mineral density changes among premenopausal women: evidence of discordant site-specific skeletal effects. *Sports Med* 2006; 36(8): 683-704.
65. Forwood MR, Turner CH. The response of rat tibiae to incremental bouts of mechanical loading: a quantum concept for bone formation. *Bone* 1994; 15(6): 603-9.
66. Pazzaglia UE, Andrini L, Di Nucci A. The effects of mechanical forces on bones and joints. Experimental study on the rat tail. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79(6): 1024-30.
67. Robling AG, Duijvelaar KM, Geevers JV, Ohashi N, Turner CH. Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone* 2001; 29(2): 105-13.
68. Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int* 2002; 13(9): 688-700.
69. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000; 80(3): 1055-81.
70. Van Hall G, Jensen-Urstad M, Rosdahl H, Holmberg HC, Saltin B, Calbet JA. Leg and arm lactate and substrate kinetics during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284(1): E193-205.
71. Mastorakos G, Pavlatou M. Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. *Horm Metab Res* 2005; 37(9): 577-84.
72. Calbet JA, Lundby C, Sander M, Robach P, Saltin B, Boushel R. Effects of ATP-induced leg vasodilation on VO₂ peak and leg O₂ extraction during maximal exercise in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291(2): R447-53.
73. Ara I, Perez-Gomez J, Vicente-Rodriguez G, Chavarren J, Dorado C, Calbet JA. Serum free testosterone, leptin and soluble leptin receptor changes in a 6-week strength-training programme. *Br J Nutr* 2006; 96(6): 1053-9.
74. Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 1992; 18(3): 227-36.
75. Bourrin S, Palle S, Pupier R, Vico L, Alexandre C. Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *J Bone Miner Res* 1995; 10(11): 1745-52.

76. Yeh JK, Liu CC, Aloia JF. Effects of exercise and immobilization on bone formation and resorption in young rats. *Am J Physiol* 1993; 264(2 Pt 1): E182-9.
77. Hagihara Y, Fukuda S, Goto S, Iida H, Yamazaki M, Moriya H. How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? *J Bone Miner Metab* 2005; 23(4): 289-94.
78. Barengolts EI, Curry DJ, Bapna MS, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone mass and mechanical properties in intact and ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1993; 8(8): 937-42.
79. Horcajada M, Coxam V, Davicco M, Gaumet N, Pastoureau P, Leterrier C, et al. Influence of treadmill running on femoral bone in young orchidectomized rats. *J Appl Physiol* 1997; 83(1): 129-33.
80. van der Wiel HE, Lips P, Graafmans WC, Danielsen CC, Nauta J, van Lingen A, et al. Additional weight-bearing during exercise is more important than duration of exercise for anabolic stimulus of bone: a study of running exercise in female rats. *Bone* 1995; 16(1): 73-80.
81. Bourrin S, Genty C, Palle S, Gharib C, Alexandre C. Adverse effects of strenuous exercise: a densitometric and histomorphometric study in the rat. *J Appl Physiol* 1994; 76(5): 1999-2005.
82. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp Anim* 2005; 54(1): 1-6.
83. Wronski TJ, Yen CF. The ovariectomized rat as an animal-model for postmenopausal bone loss. *Cell Mater Suppl* 1991; 1: 69-74.
84. Jarvinen TL, Kannus P, Pajamaki I, Vuohelainen T, Tuukkanen J, Jarvinen M, et al. Estrogen deposits extra mineral into bones of female rats in puberty, but simultaneously seems to suppress the responsiveness of female skeleton to mechanical loading. *Bone* 2003; 32(6): 642-51.
85. Sanchis-Moysi J, Dorado C, Vicente-Rodriguez G, Milutinovic L, Garces GL, Calbet JA. Inter-arm asymmetry in bone mineral content and bone area in postmenopausal recreational tennis players. *Maturitas* 2004; 48(3): 289-98.
86. Karlsson MK. Skeletal effects of exercise in men. *Calcif Tissue Int* 2001; 69(4): 196-9.
87. Layne JE, Nelson ME. The effects of progressive resistance training on bone density: a review. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31(1): 25-30.
88. Nichols DL, Sanborn CF, Essery EV. Bone density and young athletic women. An update. *Sports Med* 2007; 37(11): 1001-14.
89. Karlsson M. Has exercise an antifracture efficacy in women? *Scand J Med Sci Sports* 2004; 14(1): 2-15.
90. Daly RM, Rich PA, Klein R, Bass S. Effects of high-impact exercise on ultrasonic and biochemical indices of skeletal status: A prospective study in young male gymnasts. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7): 1222-30.

91. Alfredson H, Nordstrom P, Lorentzon R. Total and regional bone mass in female soccer players. *Calcif Tissue Int* 1996; 59(6): 438-42.
92. Morel J, Combe B, Francisco J, Bernard J. Bone mineral density of 704 amateur sportsmen involved in different physical activities. *Osteoporos Int* 2001; 12(2): 152-7.
93. Taaffe DR, Snow-Harter C, Connolly DA, Robinson TL, Brown MD, Marcus R. Differential effects of swimming versus weight-bearing activity on bone mineral status of eumenorrheic athletes. *J Bone Miner Res* 1995; 10(4): 586-93.
94. Hawkey A. The importance of exercising in space. *Interdiscip Sci Rev* 2003; 28(2): 130-8.
95. Calbet JA, Dorado C, Diaz-Herrera P, Rodriguez-Rodriguez LP. High femoral bone mineral content and density in male football (soccer) players. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(10): 1682-7.
96. Wittich A, Mautalen CA, Oliveri MB, Bagur A, Somoza F, Rotemberg E. Professional football (soccer) players have a markedly greater skeletal mineral content, density and size than age- and BMI-matched controls. *Calcif Tissue Int* 1998; 63(2): 112-7.
97. Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Royo IA, Vicente-Rodriguez G, Ortiz RA, et al. 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* 2008; 33(3): 501-10.
98. Kellis E, Katis A, Vrabas IS. Effects of an intermittent exercise fatigue protocol on biomechanics of soccer kick performance. *Scand J Med Sci Sports* 2006; 16(5): 334-44.
99. Calbet JA, Moysi JS, Dorado C, Rodriguez LP. Bone mineral content and density in professional tennis players. *Calcif Tissue Int* 1998; 62(6): 491-6.
100. Hetland ML, Haarbo J, Christiansen C. Low bone mass and high bone turnover in male long distance runners. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(3): 770-5.
101. Kannus P, Haapasalo H, Sievanen H, Oja P, Vuori I. The site-specific effects of long-term unilateral activity on bone mineral density and content. *Bone* 1994; 15(3): 279-84.
102. Haapasalo H, Kannus P, Sievanen H, Heinonen A, Oja P, Vuori I. Long-term unilateral loading and bone mineral density and content in female squash players. *Calcif Tissue Int* 1994; 54(4): 249-55.
103. Ducher G, Tournaire N, Meddahi-Pelle A, Benhamou CL, Courteix D. Short-term and long-term site-specific effects of tennis playing on trabecular and cortical bone at the distal radius. *J Bone Miner Metab* 2006; 24(6): 484-90.
104. Egan E, Reilly T, Giacomoni M, Redmond L, Turner C. Bone mineral density among female sports participants. *Bone* 2006; 38(2): 227-33.
105. Nichols JF, Rauh MJ, Barrack MT, Barkai HS. Bone mineral density in female high school athletes: interactions of menstrual function and type of mechanical loading. *Bone* 2007; 41(3): 371-7.

106. Ng MY, Sham PC, Paterson AD, Chan V, Kung AW. Effect of environmental factors and gender on the heritability of bone mineral density and bone size. *Ann Hum Genet* 2006; 70(Pt 4): 428-38.
107. Kemper HC, Post GB, Twisk JW, van Mechelen W. Lifestyle and obesity in adolescence and young adulthood: results from the Amsterdam Growth And Health Longitudinal Study (AGAHLS). *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23 Suppl 3: S34-40.
108. Armstrong N, Welsman JR. The physical activity patterns of European youth with reference to methods of assessment. *Sports Med* 2006; 36(12): 1067-86.
109. Tanner JM. Principles of growth standards. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79(10): 963-7.
110. Kohrt WM, Bloomfield SA, Little KD, Nelson ME, Yingling VR. American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36(11): 1985-96.
111. Deschenes MR, Kraemer WJ. Performance and physiologic adaptations to resistance training. *Am J Phys Med Rehabil* 2002; 81(11 Suppl): S3-16.
112. Kraemer WJ, Ratamess NA. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36(4): 674-88.
113. Kraemer WJ, Mazzetti SA, Nindl BC, Gotshalk LA, Volek JS, Bush JA, et al. Effect of resistance training on women's strength/power and occupational performances. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(6): 1011-25.
114. Kraemer WJ, Nindl BC, Ratamess NA, Gotshalk LA, Volek JS, Fleck SJ, et al. Changes in muscle hypertrophy in women with periodized resistance training. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36(4): 697-708.
115. Friedlander AL, Genant HK, Sadowsky S, Byl NN, Gluer CC. A two-year program of aerobics and weight training enhances bone mineral density of young women. *J Bone Miner Res* 1995; 10(4): 574-85.
116. Uusi-Rasi K, Sievanen H, Pasanen M, Oja P, Vuori I. Association of physical activity and calcium intake with the maintenance of bone mass in premenopausal women. *Osteoporos Int* 2002; 13(3): 211-7.
117. Snow-Harter C, Bouxsein ML, Lewis BT, Carter DR, Marcus R. Effects of resistance and endurance exercise on bone mineral status of young women: a randomized exercise intervention trial. *J Bone Miner Res* 1992; 7(7): 761-9.
118. Mayhew TP, Rothstein JM, Finucane SD, Lamb RL. Muscular adaptation to concentric and eccentric exercise at equal power levels. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27(6): 868-73.
119. Hawkins SA, Schroeder ET, Wiswell RA, Jaque SV, Marcell TJ, Costa K. Eccentric muscle action increases site-specific osteogenic response. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31(9): 1287-92.

120. Schroeder ET, Hawkins SA, Jaque SV. Musculoskeletal adaptations to 16 weeks of eccentric progressive resistance training in young women. *J Strength Cond Res* 2004; 18(2): 227-35.
121. Nickols-Richardson SM, Miller LE, Wootten DF, Ramp WK, Herbert WG. Concentric and eccentric isokinetic resistance training similarly increases muscular strength, fat-free soft tissue mass, and specific bone mineral measurements in young women. *Osteoporos Int* 2007; 18(6): 789-96.
122. Kato T, Terashima T, Yamashita T, Hatanaka Y, Honda A, Umemura Y. Effect of low-repetition jump training on bone mineral density in young women. *J Appl Physiol* 2006; 100(3): 839-43.
123. Bassey EJ, Ramsdale SJ. Increase in femoral bone density in young women following high-impact exercise. *Osteoporos Int* 1994; 4(2): 72-5.
124. Chilibeck PD, Calder A, Sale DG, Webber CE. Twenty weeks of weight training increases lean tissue mass but not bone mineral mass or density in healthy, active young women. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74(10): 1180-5.
125. Nindl BC, Harman EA, Marx JO, Gotshalk LA, Frykman PN, Lammi E, et al. Regional body composition changes in women after 6 months of periodized physical training. *J Appl Physiol* 2000; 88(6): 2251-9.
126. Sinaki M, Wahner HW, Bergstralh EJ, Hodgson SF, Offord KP, Squires RW, et al. Three-year controlled, randomized trial of the effect of dose-specified loading and strengthening exercises on bone mineral density of spine and femur in nonathletic, physically active women. *Bone* 1996; 19(3): 233-44.
127. Gilsanz V, Wren TA, Sanchez M, Dorey F, Judex S, Rubin C. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res* 2006; 21(9): 1464-74.
128. Fujimura R, Ashizawa N, Watanabe M, Mukai N, Amagai H, Fukubayashi T, et al. Effect of resistance exercise training on bone formation and resorption in young male subjects assessed by biomarkers of bone metabolism. *J Bone Miner Res* 1997; 12(4): 656-62.
129. Hartman JW, Tang JE, Wilkinson SB, Tarnopolsky MA, Lawrence RL, Fullerton AV, et al. Consumption of fat-free fluid milk after resistance exercise promotes greater lean mass accretion than does consumption of soy or carbohydrate in young, novice, male weightlifters. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(2): 373-81.
130. Ballard TL, Specker BL, Binkley TL, Vukovich MD. Effect of protein supplementation during a 6-month strength and conditioning program on areal and volumetric bone parameters. *Bone* 2006; 38(6): 898-904.
131. Ryan AS, Ivey FM, Hurlbut DE, Martel GF, Lemmer JT, Sorkin JD, et al. Regional bone mineral density after resistive training in young and older men and women. *Scand J Med Sci Sports* 2004; 14(1): 16-23.

132. Lohman T, Going S, Pamentor R, Hall M, Boyden T, Houtkooper L, et al. Effects of resistance training on regional and total bone mineral density in premenopausal women: a randomized prospective study. *J Bone Miner Res* 1995; 10(7): 1015-24.
133. Mullins NM, Sinning WE. Effects of resistance training and protein supplementation on bone turnover in young adult women. *Nutr Metab (Lond)* 2005; 2: 19.
134. Vainionpaa A, Korpelainen R, Leppaluoto J, Jamsa T. Effects of high-impact exercise on bone mineral density: a randomized controlled trial in premenopausal women. *Osteoporos Int* 2005; 16(2): 191-7.
135. Winters-Stone KM, Snow CM. Site-specific response of bone to exercise in premenopausal women. *Bone* 2006; 39(6): 1203-9.
136. Heinonen A, Kannus P, Sievanen H, Oja P, Pasanen M, Rinne M, et al. Randomised controlled trial of effect of high-impact exercise on selected risk factors for osteoporotic fractures. *Lancet* 1996; 348(9038): 1343-7.
137. Torvinen S, Kannus P, Sievanen H, Jarvinen TA, Pasanen M, Kontulainen S, et al. Effect of 8-month vertical whole body vibration on bone, muscle performance, and body balance: a randomized controlled study. *J Bone Miner Res* 2003; 18(5): 876-84.
138. Beck BR, Kent K, Holloway L, Marcus R. Novel, high-frequency, low-strain mechanical loading for premenopausal women with low bone mass: early findings. *Journal of bone and mineral metabolism* 2006; 24(6): 505-7.
139. Menkes A, Mazel S, Redmond RA, Koffler K, Libanati CR, Gundberg CM, et al. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. *J Appl Physiol* 1993; 74(5): 2478-84.
140. Huuskonen J, Vaisanen SB, Kroger H, Jurvelin JS, Alhava E, Rauramaa R. Regular physical exercise and bone mineral density: a four-year controlled randomized trial in middle-aged men. The DNASCO study. *Osteoporos Int* 2001; 12(5): 349-55.
141. Stewart KJ, Bacher AC, Hees PS, Tayback M, Ouyang P, Jan de Beur S. Exercise effects on bone mineral density relationships to changes in fitness and fatness. *Am J Prev Med* 2005; 28(5): 453-60.
142. Madeo B, Zirilli L, Caffagni G, Diazzi C, Sanguanini A, Pignatti E, et al. The osteoporotic male: overlooked and undermanaged? *Clin Interv Aging* 2007; 2(3): 305-12.
143. Hui SL, Slemenda CW, Johnston CC, Jr. The contribution of bone loss to postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 1990; 1(1): 30-4.
144. Jones HH, Priest JD, Hayes WC, Tichenor CC, Nagel DA. Humeral hypertrophy in response to exercise. *J Bone Joint Surg Am* 1977; 59(2): 204-8.
145. Province MA, Hadley EC, Hornbrook MC, Lipsitz LA, Miller JP, Mulrow CD, et al. The effects of exercise on falls in elderly patients. A preplanned meta-analysis of the FICSIT Trials. *Frailty and Injuries: Cooperative Studies of Intervention Techniques*. *Jama* 1995; 273(17): 1341-7.

146. Paganini-Hill A, Chao A, Ross RK, Henderson BE. Exercise and other factors in the prevention of hip fracture: the Leisure World study. *Epidemiology* 1991; 2(1): 16-25.
147. Wyshak G, Frisch RE, Albright TE, Albright NL, Schiff I. Bone fractures among former college athletes compared with nonathletes in the menopausal and postmenopausal years. *Obstet Gynecol* 1987; 69(1): 121-6.
148. Nelson ME, Fiatarone MA, Morganti CM, Trice I, Greenberg RA, Evans WJ. Effects of high-intensity strength training on multiple risk factors for osteoporotic fractures. A randomized controlled trial. *Jama* 1994; 272(24): 1909-14.
149. Kerr D, Morton A, Dick I, Prince R. Exercise effects on bone mass in postmenopausal women are site-specific and load-dependent. *J Bone Miner Res* 1996; 11(2): 218-25.
150. Pruitt LA, Jackson RD, Bartels RL, Lehnhard HJ. Weight-training effects on bone mineral density in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1992; 7(2): 179-85.
151. Kohrt WM, Snead DB, Slatopolsky E, Birge SJ, Jr. Additive effects of weight-bearing exercise and estrogen on bone mineral density in older women. *J Bone Miner Res* 1995; 10(9): 1303-11.
152. Ryan AS, Treuth MS, Hunter GR, Elahi D. Resistive training maintains bone mineral density in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1998; 62(4): 295-9.
153. Stengel SV, Kemmler W, Pintag R, Beeskow C, Weineck J, Lauber D, et al. Power training is more effective than strength training for maintaining bone mineral density in postmenopausal women. *J Appl Physiol* 2005; 99(1): 181-8.
154. Basseij EJ, Rothwell MC, Littlewood JJ, Pye DW. Pre- and postmenopausal women have different bone mineral density responses to the same high-impact exercise. *J Bone Miner Res* 1998; 13(12): 1805-13.
155. Sugiyama T, Yamaguchi A, Kawai S. Effects of skeletal loading on bone mass and compensation mechanism in bone: a new insight into the "mechanostat" theory. *J Bone Miner Metab* 2002; 20(4): 196-200.
156. Palombaro KM. Effects of walking-only interventions on bone mineral density at various skeletal sites: a meta-analysis. *J Geriatr Phys Ther* 2005; 28(3): 102-7.
157. Chien MY, Wu YT, Hsu AT, Yang RS, Lai JS. Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2000; 67(6): 443-8.
158. Kohrt WM, Ehsani AA, Birge SJ, Jr. Effects of exercise involving predominantly either joint-reaction or ground-reaction forces on bone mineral density in older women. *J Bone Miner Res* 1997; 12(8): 1253-61.
159. Bergmann G, Graichen F, Rohlmann A. Hip joint loading during walking and running, measured in two patients. *J Biomech* 1993; 26(8): 969-90.
160. Gusi N, Raimundo A, Leal A. Low-frequency vibratory exercise reduces the risk of bone fracture more than walking: a randomized controlled trial. *BMC musculoskeletal disorders* 2006; 7: 92.

161. Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, Swinnen S, Vanderschueren D, Boonen S. Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. *J Bone Miner Res* 2004; 19(3): 352-9.
162. Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res* 2004; 19(3): 343-51.
163. Zehnacker CH, Bemis-Dougherty A. Effect of weighted exercises on bone mineral density in post menopausal women. A systematic review. *Journal of geriatric physical therapy* (2001) 2007; 30(2): 79-88.
164. Englund U, Littbrand H, Sondell A, Bucht G, Pettersson U. The beneficial effects of exercise on BMD are lost after cessation: a 5-year follow-up in older post-menopausal women. *Scand J Med Sci Sports* 2008.
165. Mackey DC, Lui LY, Cawthon PM, Bauer DC, Nevitt MC, Cauley JA, et al. High-trauma fractures and low bone mineral density in older women and men. *JAMA* 2007; 298(20): 2381-8.
166. Maddalozzo GF, Snow CM. High intensity resistance training: effects on bone in older men and women. *Calcif Tissue Int* 2000; 66(6): 399-404.
167. Ryan AS, Treuth MS, Rubin MA, Miller JP, Nicklas BJ, Landis DM, et al. Effects of strength training on bone mineral density: hormonal and bone turnover relationships. *J Appl Physiol* 1994; 77(4): 1678-84.
168. Frost HM. Some effects of basic multicellular unit-based remodelling on photon absorptiometry of trabecular bone. *Bone and mineral* 1989; 7(1): 47-65.
169. Forwood MR, Burr DB. Physical activity and bone mass: exercises in futility? *Bone Miner* 1993; 21(2): 89-112.
170. Ducher G, Prouteau S, Courteix D, Benhamou CL. Cortical and trabecular bone at the forearm show different adaptation patterns in response to tennis playing. *J Clin Densitom* 2004; 7(4): 399-405.

Table 1. Bone adaptation to treadmill training in rats.

Reference	Subjects			Frequency	Training Intensity	Protocol Time	Other	Bone	
	N	M/F	Age (wk)					Measurement site (s)	Results
Barengolts et al. [78]	OXE=20 OXS=20	F	36	4/wk 40min/day	21 m/min	3 mo	7% grade treadmill Ovariectomized rats	DXA femur, tibia, L4	Prevention of bone loss
Hagjigara et al. [77]	ER=5 ER2=5 ER3=5 C=5	F	8	4-7/wk 30min/day	15 m/min	8 wk		QTC- trabecular L2, tibia, femur	↑ L2, tibia, femur ER,vs C
Bourrin et al. [75]	ER=20	M	9	7/wk	60% VO2max	5 wk		HPC-tibia	↑27%volume ↑8% trabeculae
Bourrin et al. [81]	ER=20	M	5	7/wk	80% VO2max	11 wk		HPC-tibia, L2, T2	↓ volume ↓ trabeculae
Horcajada et al. [79]	SHE=20 CXE=20 C=20	M	6	7/wk 15-60min/day	15-60 m/min 60% VO2max	3 mo	Orchidectomized rats	DXA-femur	↑ Femur BMD in CXE, SHE vs C
Yeh et al. [76]	ER=28 DR=24 C=30	F	6	5/kw	20 m/min	6 wk	Denervated rats	HPC-tibia	↑ cortical bone area in ER vs DR, C
Van der Wiel et al. [80]	ER1=10 ER2=10 ER3=10 C=14	F	20	5/kw	20 m/min	17 wk	ER1: no extra load 30' ER2: 50g load 30' ER3: 50g load 15'	DXA-WB, LL,	↑ 16% LL BMD ER1 vs C ↑ 15% LL BMD ER2 vs C ↑ 15% WB, 20% LL BMD ER3 vs C

Number of subjects (N); Male/Female (M/F); Months (mo); Significant increase $P<0.05$ (↑); Significant decrease $P<0.05$ (↓); Ovariectomized exercising rats (OXE); Ovariectomized sedentary rats (OXS); Exercising rats (ER); Sham-operated exercising rats (SHE); Castrated exercising rats (CXE); Controls (C); Sciatic denervated rats (DR); Fourth lumbar vertebra (L4); Second lumbar vertebra (L2); Second thoracic vertebra (T2); Whole body (WB); Lower limbs (LL); Quantitative computed tomography (QTC); Histomorphometric analysis (HP)

Table 2. Effects of sports training on bone tissue adaptations in young adult men and women. Cross-sectional studies

Reference	Subjects					Sport	Bone		
	N	M/F	Age (yrs)	Sports History (mean time)	Training Volume (mean time)		Measurement Site (s) DXA	Results	
								BMD	BMC
Young Men									
Calbet et al. [95]	EX=33 C=19	M	19-27	EX= 12 yrs	7h/wk	Football (soccer)	WB, SP, FN, IT, GT, WT, WL	↑10% SP vs C ↑21% FN vs C ↑19% IT vs C ↑21% GT vs C ↑27% WT vs C ↑10% WL vs C ↑ 10% WB RGB vs OS ↑2% WB FS vs OS ↑2% WB BB vs OS	↑13% WB vs C ↑13% SP vs C ↑24% FN vs C ↑18% IT vs C ↑23% GT vs C ↑24% WT vs C ↑16% WL vs C
Morel et al. [92]	REX=126 RGB=110 FS=44 BB=28 SW=14	M	25-40	REX= 22 yrs RGB= 15 yrs FS= 18 yrs BB= 16 yrs SW= 11 yrs	8.1h/wk 8.7h/wk 9.1h/wk 8.1h/wk 8.7h/wk	Running; Rugby; Fighting; Body Building; Swimming	WB, A, WL, SP, S	↓8% WB SW vs OS ↑5% A RGB vs OS ↑4% A FS vs OS ↑9% WL RGB vs OS ↑1% WL FS vs OS ↓5% WL BB vs OS ↑15% SP EX vs C ↑10–15% FN EX vs C	↑13% WB vs C ↑13% SP vs C ↑24% FN vs C ↑18% IT vs C ↑23% GT vs C ↑24% WT vs C ↑16% WL vs C
Calbet et al. [99]	EX=9 C=13	M	21-32	EX= 17yrs	25h/wk	Tennis	WB, A, SP, FN, WT, WL	↑11% WB vs C ↑14% PR vs C ↑14% WL vs C	↑5%DAP vs NDAP ↑15% WB vs C ↑25% PR vs C ↑20% WL vs C
Wittich et al. [96]	EX=24 C=22	M	20-24	EX= 8 yrs	20h/wk	Football (soccer)	WB, WL, PR	↑11% WB vs C ↑14% PR vs C ↑14% WL vs C	↑15% WB vs C ↑25% PR vs C ↑20% WL vs C

Young Women									
Egan et al. [104]	REX=11 RGB=30 NB=20 C=25	F	19-23	REX= 9 yrs RGB= 4 yrs NB= 4 yrs	8.4h/wk 4.1h/wk 3.7h/wk	Running; Rugby; Netball;	WB, SP, LPF	↑WB All sports vs C ↑13.5% RGB WB vs C ↑16.5% SP RGB vs C ↑21.7% FN RGB vs C	
Nichols et al. [105]	HOAEX=21 HEX=72 ROAEX=17 RNEX=51	F	14-16	HOAEX;HEX= 6.5 yrs ROAEX; RNEX=6.1 yrs	8.6h/wk 8.5h/wk	Soccer; Volleyball; Softball; Tennis; Lacrosse; Running; Swimming	WB, SP, WH, FN, GT	↑4% HEX WH vs HOAEX ↑7% HEX GT vs HOAEX ↑10% HEX LS vs ROAEX ↑5% HEX LS vs ROAEX	
Alfredson et al. [91]	EX=16 C=13	F	18-27		6h/wk	Football (soccer)	WB, SP, S, FN, WT, T, H, FD, PT	↑10.7% SP vs C ↑13.7% FN vs C ↑19.6% WT vs C ↑12.6% FD vs C ↑12% PT vs C	
Ducher et al. [170]	EX=47 C=58	M/F	20-25	EX= 14yrs	3h/wk	Tennis	R (UDR, MDR, TDR)	↑ 4.8 % TDR DAP vs NDAP	↑ 15.6 % MDR DAP vs NDAP ↑ 13.3% TDR DAP

Number of subjects (N); Male/Female (M/F); Exercising subjects (EX); Significant increase $P<0.05$ (↑); Significant decrease $P<0.05$ (↓)
Control subjects (C); Other sports subjects (OS); Running Exercise subjects (REX); Rugby players (RGB); Fighting sports subjects (FS);
Body builders (BB); Swimmers (SW); Netball players (NB); High/odd impact oligo/amenorreic athletes (soccer, volleyball, softball, tennis
and lacrosse) (HOAEX); Repetitive/non-impact oligo/amenorreic athletes (runners, swimmers) (ROAEX); High/odd impact eumenorreic
athletes (soccer, volleyball, softball, tennis and lacrosse) (HEX); Repetitive/non-impact eumenorreic athletes (runners, swimmers) (RNEX);
Whole Body (WB); Lumbar spine (SP); Skull (S); Whole Hip (WH); Femoral Neck (FN); Ward's Triangle (WT); Tibia (T); Humerus (H);
Femur Diaphysis (FD); Proximal tibia (PT); Intertrochanteric subregion (IT); Greater trochanter (GT); Whole leg (WL); Pelvic region (PR)
Arms (A); Radius (R); Ultradistal radius region (UDR); Mid-distal radius region (MDR); Third-distal radius region (TDR); Dominant arm
tennis players (DAP); Non-dominant arm tennis players (NDAP);Left proximal femur (LPF)

Table 3. Effects of training protocols on bone tissue adaptations in young and middle-aged women. Longitudinal studies.

Reference	Subjects			Training	Frequency	Exercises	Protocol Time	Training Intensity	Other	Bone Measurement site (s)	Results
	N	M/F	Age (yr)								
Young Women											
Friedlander et al. [115]	EX=63	F	20-35				24 mo		1500 mg Ca/S		
Schroeder et al. [120]	HRT=14 LRT=14 C=9	F	22-26	ERT	2/wk, 3setsx10rep	Seated chest press; latissimus pulldown; biceps curl; triceps extension; single-leg extension; double leg curl	4 mo	HRT: 125% 1RM LRT: 75% 1RM		WB, SP, F	↑ 1.7% SPBMD in LRT
Hawkins et al. [119]	EX=8 C=8	F	19-23	CO-E RT	3/wk CO: 3setsx4rep E: 3setsx3rep	Isokinetic knee flexion and extension	4.5 mo	E: 1RM CO:1RM		WB, SP, F	↑3.9% FBMD in ERT ↑ FBMD ERT vs C
Nickols-Richardson et al. [121]	EEX=37 COEX= 33	F	18-26	UET UCT	3/wk 1-3setsx 6-rep 30rep/ /limb/session	Isokinetic arm and leg resistance training	5 mo	MVE		WB, TPF, DT, TF	↑ 1.2% WB, 5% TF BMC in EEX ↑ 1.1% TPF, 0.5% TF BMD in EEX ↑ 0.9% WB, 4% TF BMC in COEX ↑ 0.6% TF, 0.5%TPF BMD in COEX
Kato et al. [122]	EX=18 C= 18	F	20-22	HIT	3/wk 1 set x 10 rep	Countermovement jumps	6 mo	MVE	300 mg Ca/S in	SP, FN, GT, WT	↑ 2.6% FN, 2.4% SP BMD in EX
Bassey et al. [123]	EX=14 C=13	F	27-34	HIT	3/wk	Jumping, skipping	12 mo	MVE		R, SP, FN, GT, WT	↑ 4.1% GT BMD in EX
Sinaki et al. [126]	EX=60 C= 60	F	30-40	RT	3/wk 3 sets x 10 rep	Back extension and shoulder girdle weight lifting exercises	36 mo	50-100% 10 RM	Physically active women	WB, SP, WH, R	NC
Chilibeck et al. [124]	EX=20 C=10	F	19-21	RT + ET	2/wk	Arm curl, bench press, leg press	4.5 mo			WB, SP, L, A, FN, WT, GT, IT	NC

Nindl et al. [125]	EX=26 C=5	F	24-32	RT	5/wk 4-6setx10-12rep	Squat, bench press, sit up, leg curl, row with elbows low + aerobics	6 mo			WB, L, A, Tr	NC
Premenopausal women											
Lohman et al. [132]	EX=22 C=34	F	28-39	RT	3/wk 3setsx8-12rep	Bicep curl, bench press, supine flys, Latissimus pulldown, leg curl, leg Extension, leg press, military press, low Rows, right wrist curl.	18 mo	75-80% 1RM	500 mg Ca/S in RT,C	WB, SP, FN, A, L	↑ SPBMD in EX ↑ FNBMD in EX
Vainionpää et al. [134]	EX=39 C=41	F	35-40	HIT	3/wk	Step patterns, stamping, jumping, running, walking	12 mo	MVE		SP, F, FN, IT, DF.	↑ 1.1 FNBMD EX vs C ↑ 0.8 ITBMD EX vs C ↑ 0.1 FBMD EX vs C ↑ 2.2 L1BMD EX vs C
Winters-Stone and Snow [135]	LEX= 19 ULEX=16 C=24	F	34-44	RT + HIT	3/wk 3-9sets x 8-12 rep	LEX: jumps, squat, lunges, calf raises. ULEX: LEX+upright row, one-arm row, latissimus dorsi pull down, chest press, chest fly, biceps curl, triceps extension	12 mo	↑ 0-13% BW		WB, SP, FN, GT	↑ 2.6% GTBMD ULEX vs C ↑ 2.2% GTBMD LEX vs C ↑ 1.3% SPBMD ULEX vs C
Heinonen et al. [136]	EX= 49 C=49	F	35-45	HIT	3/wk	Jumping, callisthenics	18 mo	2-6 times BW		SP, FN, GT, TDF,R	↑ 1.6% FNBMD in EX

Number of subjects (N); Male/Female (M/F); Significant increase $P<0.05$ (↑); Significant decrease $P<0.05$ (↓); No changes (NC); Exercising subjects (EX); Eccentric exercising subjects (EEX); Concentric exercising subjects (COEX); High-intensity eccentric resistance training (HRT) subjects ; Low-intensity eccentric resistance training (LRT); Lower body exercising subjects (LEX); Upper+Lower body exercising subjects (ULEX); Control subjects (C); 1 Repetition maximum (1RM); Percentage of body weight (%BW); Maximal voluntary effort (MVE); Resistance training (RT); Eccentric resistance training (ERT); Concentric-eccentric resistance training (CO-E RT); Unilateral eccentric training (UET); Unilateral concentric training (UCT); High-impact training (HIT); Endurance training (ET); Supplemental calcium (Ca/S); Whole Body (WB); Lumbar spine (SP); Whole Hip (WH), Femoral Neck (FN); Ward's Triangle (WT); Distal tibia (DT); Femur Diaphysis (FD); Intertrochanteric subregion (IT); Greater trochanter (GT); Whole leg (L); Arms (A); Radius (R); Trunk (Tr); Total Forearm (TF); Distal forearm (DF); Total proximal femur (TPF); Total distal femur (TDF)

Table 4. Effects of training protocols on bone tissue adaptations in young, middle-aged men and age-specific gender comparisons. Longitudinal studies.

Reference	Subjects			Training	Frequency	Exercises	Protocol Time	Training Intensity	Other	Bone Measurement site (s)	Results
	N	M/F	Age (yr)								
Young men											
Hartman et al. [129]	EXM=18 EXS=19 C= 19	M	18-30	RT	5/wk 2-4 sets x 4-12rep	military press, bench press, seated chest fly, seated triceps extension, seated lateral pull down, seated wide grip row, seated reverse fly, seated biceps curl, abdominals, inclined leg press, 2-leg knee extension, 2-leg hamstring curl, seated calf raise	3 mo	80% 1RM	500 ml M/S in EXM 500 ml S/S in EXS. 500 ml C/S in C	WB	NC
Ballard et al. [130]	YMEX=13 YWEX= 12 CM= 12 CW=11	M/F	20-22	RT+ET	5/wk 3setsx12-failure rep	Bench press, inclined bench press, shoulder press, latissimus pull down, cable rows, arm curl and extensions, hip sled, squats, calf raises +aerobics	6 mo	70% 1RM; 70% VO2max	EX: 42g P/S C: 70g C/S	T, WB, A, L	↑ T vBMD in YMEX and YWEX ↑ ABMC in YMEX and YWEX
Ryan et al. [131]	YWEX=8 OWEX=11 YMEX=13 OWEX=12	M/F	Y=20-29 O=65-74	RT	3/wk, 2sets, failure	Leg press; chest press; leg curl; latissimus pulldown; leg extension; military press; seated row; triceps pulldown; abdominal crunch; biceps curl; sit ups.	6 mo	12-15 RM		WB, SP, FN, WT, GT	↑ FNBM in ESP
Fujimura et al. [128]	EX= 8 C=7	M	23-31	RT	3/wk 2-3setsx10rep	Leg extension; leg curl; bench press, sit up, back extension, arm curl, wrist curl, half squat leg lunge, lateral pull down, back press.	4 mo	60-80% 1RM		WB, FN, SP, R	NC
Middle aged men											
Huuskonen et al. [140]	EX=70 C=70	M	50-60	ET	3-5/wk 30-60 min	Brisk walking	48 mo	40-60% VO2max		SP, FN, GT, WT	↓ SP, FN, GT, WT BMD in EX
Menkes et al. [139]	EX=11 C=7	M	54-61	RT	3/wk 1-2setsx15rep	Chest press; overhead press; lat pull; upper back row; leg press, leg extension	4 mo	5-15RM		SP, FN	↑ 2.0% SP in EX ↑ 3.8% FN in EX

Number of subjects (N); Male/Female (M/F); Significant increase $P<0.05$ (↑); Significant decrease $P<0.05$ (↓); No changes (NC); Exercising subjects (EX); Young women exercising subjects (YWEX); Older women exercising subjects (OWEX); Young men exercising subjects (YMEX); Older men

exercising subjects (OMEX); Young (Y); Old (O); Female control subjects (CW); Male control subjects (CM); Control subjects (C); Entire study population (ESP); 1 Repetition maximum (1RM); Maximum oxygen volume consumption (VO_2 max); Resistance training (RT); Endurance training (ET); Supplemental protein (P/S) ; Supplemental carbohydrate (C/S); Supplemental milk (M/S); Supplemental Soy (S/S) Whole Body (WB); Lumbar spine (SP); Femoral Neck (FN); Ward's Triangle (WT); Tibia (T); Greater trochanter (GT); Whole leg (L); Arms (A); Radius (R); Volumetric bone mineral density (vBMD).

Table 5. Effects of training protocols on bone tissue adaptations in older women, men and age-specific gender comparisons. Longitudinal studies.

Reference	Subjets			Training	Frequency	Exercises	Protocol Time	Training Intensity	Other	Bone Measurement site (s)	Results
	N	M/F	Age (yr)								
Older women											
Nelson et al. [148]	EX=20 C=19	F	50-70	RT	2/wk 3setx8rep	5 weight lifting exercises.	12 mo	80% 1RM		WB, SP, FN	↑ 1% SPBMD in EX ↑ 1% FNBMD in EX ↓ 1.8% SPBMD in C ↓ 2.5% FNBMD in C
Kerr et al. [149]	REX EEX C			RT ET			12				
Kohrt et al [149]	REX C	F		RT	3/wk	Weight bearing exercises	12mo		HRTh		
Stengel et al. [153]	PEX=21 REX=21	F	54-60	PT RT	4/wk	2 weight lifting sessions 1 gymnastics session 1 home training session	12 mo	70-90%1RM	1.500 mg Ca/S, 500 Vit-D/S	SP, WH, FN, T, IT	NC FNBMD in PEX NC SPBMD in PEX ↓ 0.9% SPBMD in REX ↓ 1.2% WHBMD in REX
Chien et al. [157]	EX=22 C=21	F	48-65	ET+HIT	3/wk 50 min	Treadmill walking + stepping exercise	6 mo	70-85% VO2max	Osteopenic subjects HRTh	WB, SP, FN	↑ 6.8% FNBMD in EX
Kohrt et al, [158]	GREX JREX C	F	60-74	ET RT+ET	3/wk GREX: 30-45 min JREX: 2-3setsx8-12 rep 15-20 min	GREX: walking, jogging, stair climbing JREX: overhead press; biceps curl; triceps extension; leg press; leg extension; leg flexion; bench press, squats.	11 mo	GREX: 60-85 MHR JREX: 8-12 RM, 60-85 MHR		WB, SP, FN, GT, W	↑ 2.0% WBBMD in GREX ↑ 1.6% WBBMD in JREX ↑ 1.8% SPBMD in GREX ↑ 1.5% SPBMD in JREX ↑ 6.1% GTBMD in GREX ↑ 5.1% GTBMD in GREX

Table 5. Effects of training protocols on bone tissue adaptations in older women, men and age-specific gender comparisons. Longitudinal studies (Cont.).

Verschueren et al. [161]	VEX: 25 EX: 22 C: 23	F	60-70	VEX: RT+WBV EX: RT	VEX,EX: 3/wk 1-3setsx10-15rep	VEX and EX: leg extension, leg press	6mo	VEX, EX: 20-8RM		WB, F, SP	↑0.9% FBMD in VEX NC in EX and C
Pruitt et al. [150]	EX: 17 C: 10	F	52-56	RT	3/wk 1 setx10-15rep	Biceps curl; lat pull down; bench press; wrist roller; leg press; leg ab/adduction; leg curl; leg extension; trunk extension; hip extension; lateral flexion	9mo	10-15 RM		SP, FN	↑1.6% SPBMD in EX ↓ 3.6% SPBMD in C

Table 5. Effects of training protocols on bone tissue adaptations in older women, men and age-specific gender comparisons. Longitudinal studies (Cont. next page).

Older men											
Maddalozzo et al. [166]	MMEX=12 HMEX=12 MWEX=9 HWEX=9	M/F	50-60	MRT HRT	MRT: 3/wk 3setsx10-13rep HRT: 3/wk 3setsx2-10rep	M: Leg press; Leg extension hamstring curls, arm curl, triceps press, chest press; Pec deck;shoulder press; side lateral raise; lat pulldown; seated row; abdominal crunch; calf raise H: free weight back squat, deadlift, biceps curls, sit ups, triceps extension, chest press, incline shoulder press, high lat pull down, leg curl, gripper, calf raise.	6 mo	MRT: 40-60% 1RM HRT: 70-90% 1RM		WH, FN, GT, SP	↑1.9% SPBMD HMEX ↑1.3% GTBMD HMEX ↑2.0% GTBMD HWEX
Ryan et al. [167]	EX=21 C=16	M	51-71	RT	3/wk 2setsx15rep	Leg press; chest press; leg c curl; lat pull down, leg extension, military press, adductor, abductor, upper back, triceps, lower back, abdominals, biceps curl.	4 mo	5RM	Dietary control	WB, SP, FN	↑ 2.8% FNBMD in EX
Stewart et al. [141]	MRT=26 WRT=31 C=58	M/F	55-75	RT+ET	3/wk, 2setsx10-15rep	bench press, shoulder press, seated mid-rowing, lat pull-down, leg extension, leg curl, leg press.	6 mo		Hypertensive subjects	WB, SP, FN, IT, WH	↑ 1.7% SPBMD in MRT

Number of subjects (N); Male/Female (M/F); Significant increase $P<0.05$ (↑); Significant decrease $P<0.05$ (↓); No changes (NC).; Exercising subjects (EX); Resistance training exercising subjects (REX); Endurance training exercising subjects (EEX); Power exercising subjects (PEX); Ground reaction forces exercising subjects (GREX); Joint reaction forces exercising subjects (JREX); Vibratory exercising subjects (VEX)Men moderate intensity exercising subjects (MMEX); Women moderate intensity exercising subjects (MWEX); Men high intensity exercising subjects (HMEX); Women high intensity exercising subjects (HWEX); Resistance training (RT); Endurance training (ET); Power training (PT); High-impact training (HIT); Whole body vibration (WBV); Moderate resistance training (MRT); High intensity resistance training (HRT); 1 Repetition maximum (1RM); Maximum oxygen volume consumption (VO_2 max); Maximal heart rate (MHR); Hormone replacement therapy (HRTh); Supplemental calcium (Ca/S); Supplemental vitamin D (Vit-D/S); Whole Body (WB); Whole hip (WH); Lumbar spine (SP); Femoral Neck (FN); Greater trochanter (GT); Tibia (T); Intertrochanteric subregion (IT); Wrist (W), Femur (F).

ESTUDIO II

Strength training combined with plyometric jumps in adults: Gender differences in fat-bone axis adaptations.

Guadalupe-Grau A¹, Perez-Gomez J^{1,2}, Olmedillas H¹, Chavarren J¹, Dorado C¹, Santana A^{3,4}, Serrano-Sanchez JA¹, Calbet JAL¹.

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 Department of Physical Education, University of Extremadura, Faculty of Sport Science, Avd Universidad s/n, Cáceres, 10071, 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

Running title: “strength training and the fat mass-bone axis”

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

1 **Abstract**

2 Leptin and osteocalcin play a role in the regulation of the fat-bone axis and may be
3 altered by exercise. To determine if osteocalcin influences fat mass in humans fed *ad*
4 *libitum* and if there is a gender dimorphism in the serum osteocalcin and leptin
5 responses to strength training combined with jumps, we studied forty-three male (age
6 23.9 ± 2.4 years, mean \pm SD) and twenty-three female physical education students (age
7 23.2 ± 2.7 years). Subjects were randomly assigned to two groups: training (TG) and
8 control (CG). TG followed a strength combined with plyometric jumps training during
9 nine weeks, while the CG did not train. Physical fitness, body composition (DEXA) and
10 serum concentrations of hormones (ELISA) were determined pre- and post-training. In
11 the whole group of subjects (pre-training) the serum concentration of osteocalcin was
12 positively correlated ($P < 0.05$) with: whole body bone mineral content (BMC) ($r = 0.31$)
13 and lean mass (LM) ($r = 0.43$), lower extremities BMC ($r = 0.36$), bone mineral density
14 (BMD) ($r = 0.29$), and LM ($r = 0.42$), and 1RM in inclined leg press ($r = 0.28$), leg
15 extension ($r = 0.27$), and leg curl ($r = 0.35$), and serum free testosterone concentration
16 ($r = 0.32$). However, osteocalcin was negatively correlated with leptin concentration ($r = -$
17 0.37), fat mass ($r = -0.31$) and the % body fat ($r = -0.44$). Both genders experienced similar
18 relative improvements in performance, LM (+4-5%) and whole body (+0.78%) and
19 lumbar spine BMC (+1.2-2%) with training. Serum osteocalcin concentration was
20 increased after training by 45 and 27% in men and women, respectively ($P < 0.05$),
21 however fat mass was not significantly altered by training. Serum leptin concentration
22 was reduced with training only in women. In summary, while the relative effects of
23 strength training+plyometric jumps in performance, muscle hypertrophy and
24 osteogenesis are similar in men and women, serum leptin concentration are only

1 reduced in women. Osteocalcin does not influence fat mass in physically active adults

2 fed *ad libitum*.

3

1 **Introduction**

2 There is a cross-talk between the adipose tissue and the skeleton (29). Osteocalcin is a
3 hormone produced by osteoblasts which acts as a negative regulator of fat mass,
4 protecting against diet induced obesity in rodents (16). In turn, the adipose tissue
5 produces leptin, which concentration in blood is proportional to the fat mass (20). For a
6 given fat mass, however, women have greater circulating leptin levels than men (20).
7 Contradictory effects of leptin on bone mass have been reported (17, 26). In cell
8 cultures, leptin promotes proliferation of osteoblasts, and collagen synthesis and
9 mineralization (18). However, studies in rodents have revealed that via a hypothamic
10 relay in the ventromedial hypothalamic (VMH) nuclei and two neural mediators, the
11 sympathetic tone and CART (cocaine amphetamine regulated transcript), both acting on
12 the osteoblast, leptin promotes bone loss (44). Sympathetic tone and CART inhibit bone
13 resorption while sympathetic tone also reduces bone formation (14). Human
14 epidemiological studies, have reported a positive association between leptin and BMC
15 and BMD in men and women (5, 37). However, when these analyses are adjusted for fat
16 mass, leptin has been reported to be either positively (45) or negatively (5) associated
17 with BMD.

18 Load-wearing exercises, strength training and, in general, exercises that generate
19 high tensions and impacts on bones enhance plasma osteocalcin concentration and bone
20 mass (19, 38, 48, 50). Few studies have directly compared the osteogenic response to
21 mechanical stimulation in men and women (6, 19). However, no single study has
22 determined the osteocalcin response to a training program combining strength training
23 with jumping exercises in women and men, with their corresponding control groups.

24 An important factor, often overlooked, when studying the osteogenic effects of
25 an exercise program is the accompanying level of muscle hypertrophy. Muscle mass is

1 independently associated to bone mass (22, 40, 49) and animal models like the
2 myostatin knockout mouse, have shown increased bone mass associated with muscle
3 hypertrophy (22). Studies that used training protocols equal in volume, intensity and
4 duration for both sexes indicate that despite women having less initial strength and
5 smaller myofibers than men, relative strength gains (1, 21, 30, 42), and myofiber and
6 muscle hypertrophy (24, 30, 43) are similar in men and women. Since women train with
7 lower absolute loads, i.e. the absolute tensions generated on bones are also lower, we
8 hypothesised that women compared to men would have an attenuated osteogenic
9 response to strength training that would be reflected in lower enhancement of plasma
10 osteocalcin concentrations.

11 Although in men strength training does not seem to influence plasma leptin
12 concentration, at least when body fat mass is not reduced (4), less is known about the
13 effect of strength training on plasma leptin concentration in women. Moreover, the
14 possibility of an interaction between the changes in plasma leptin, osteocalcin and fat
15 mass in response to strength training has not been studied in humans. The latter could
16 explain a hypothetical gender dimorphism in bone and fat mass adaptations to strength
17 training.

18 Therefore, the main aims of this study were: to determine if osteocalcin
19 influences fat mass in humans fed *ad libitum*; and to find out if there is a gender
20 dimorphism in the serum osteocalcin and leptin responses to strength training, and if the
21 changes in osteocalcin and leptin are associated.

1 **Methods**

2 *Subjects*

3 Fifty-seven male and 31 female physical education students were recruited through
4 advertisements in the University of Las Palmas de Gran Canaria. Twenty-one men and
5 thirteen women were randomly assigned to the strength training group (TG) and the
6 rest, i.e., 36 men and eighteen women served as control group (CG). However, thirteen
7 men and three women from the control group were excluded due to incomplete
8 adherence to the study requisites (starting an exercise program during the study and
9 missing tests, were the main reasons). One man and five women from the training
10 groups dropped out or were excluded for the same reasons as some control were
11 excluded from the study. Thus, the study was finalised with forty-three male physical
12 education students (age 23.9 ± 2.4 years, height 176.7 ± 7.1 cm, body mass 73.2 ± 10.1
13 kg; mean \pm SD) and twenty-three female physical education students (age 23.2 ± 2.7
14 years, height 164.6 ± 6.3 cm, body mass 59.9 ± 5.8 kg; mean \pm SD). Their initial
15 physical characteristics are presented in Table 1. All of the subjects were healthy,
16 physically active, non-smokers, and were not taken drugs or medications. The study was
17 performed in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as regards the conduct
18 of clinical research, being approved by the Ethical Committee of the University of Las
19 Palmas de Gran Canaria. Subjects provided their written consent before participating in
20 the study.

21

22 *Study design*

23 The study protocol consisted of 9 wk, 3 d/wk of supervised experimental strength
24 training combined with plyometric jumps (see below). Control groups were physical
25 education students, with moderate levels of physical activity as required by their

1 academic activities, but not following any regular training program. Each subject
2 performed two test sessions, one before and one after nine weeks of training. In both
3 sessions body composition was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)
4 and by the maximum weight that could be lifted at least once per exercise (1RM) used
5 to determinate the training intensity. Baseline testing was completed during the first
6 week. Resting blood samples were drawn at baseline and at the end of the study, 48-72
7 h after the last training session. Venous blood samples from an antecubital vein were
8 taken between 7 and 8 a.m. after an overnight fasting. The blood samples were allowed
9 to clot at 4°C and then centrifuged (3500 rpm, 15min) at the same temperature (Allegra
10 21R, Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA, USA). The serum obtained was
11 separated and frozen at -80°C for later analysis.

12

13 *Anthropometry and body composition*

14 Anthropometric measurements were obtained on each subject. Height was measured in
15 the upright position to the nearest millimetre (Atlántida, Barcelona, Spain). Body mass
16 was determined using a balance with a 50 g imprecision (Atlántida, Barcelona, Spain),
17 calibrated with M1 calibration masses (tolerance <0.005% in mass). Total and regional
18 body composition was assessed by DXA (Hologic QDR-1500, Hologic Corp., software
19 version 7.10, Waltham, MA, USA) as described elsewhere (10, 11). DXA equipment
20 was calibrated using a lumbar spine phantom and following the Hologic guidelines.
21 Subjects were scanned in supine position and the scans were performed in high
22 resolution. Lean mass (g), fat mass (g), total area (cm²), and BMC (g) were calculated
23 from total and regional analysis of the whole body scan. BMD (g · cm⁻²) was calculated
24 using the formula $BMD = BMC \cdot area^{-1}$. Two additional examinations were conducted
25 to estimate bone mass at the lumbar spine and proximal region of the femur. Bone

1 mineral content and density values of the femoral neck, greater trochanter, inter-
2 trochanteric, and Ward's triangle subregions are also reported.

3

4 *Strength assessment and strength-training program*

5 The TG followed a training program consisting on 3 sessions per week, during nine
6 weeks (Table 2). During the first part of the training session, subjects performed
7 plyometric exercises: drop jumps and hurdles, 5 hurdles 1m apart fixed at 50cm of
8 height. The second part of each training session consisted on 4 weight-lifting exercises
9 performed in this order: inclined leg press (ILP), leg extension (LE), half squat (HS)
10 and leg curl (LC). These exercises were executed on weight-lifting exercise machines
11 (Technogym Ltd, Barcelona, Spain). The half squat and inclined leg press exercises
12 were performed with a range of motion between full extension and a knee angle of 90°.
13 All the available range of motion was used during the leg extension. For the leg curl,
14 each subject lifted the device until contact with the thigh. Verbal signals, in all
15 exercises, from the tester were used to encourage subjects to lift the load to the initial
16 position. A 90-s rest period was allowed between exercise sets (Table 2).

17 Maximum strength (1RM) for all exercises used during training was assessed
18 immediately before and at the end of the strength training period. Before the 1RM
19 attempt subjects warmed up by doing 10 minutes of stationary cycling followed by 10
20 repetitions lifting approximately 50% of perceived maximum. Then, they performed
21 two lifts with progressively heavier weights until the 1RM was determined. To
22 minimise fatigue 3- to 5-min resting periods were allowed between trials. The 1RM
23 values obtained were subsequently used to calculate the relative loads for the training
24 protocol. The relative loads for each exercise ranged between 50% and 90% of the 1RM
25 load (Table 2). To ensure this training intensity the 1RM test were repeated every three

1 weeks and the load adjusted accordingly. All subjects finished the training programme
2 completing a total of 536 sets.

3

4 *Maximal isometric force*

5 The maximal isometric force (MIF) during leg extension in the squat position (knees
6 bent at 90°, hip bent at 110°) was measured with a force plate (Kistler, Winterthur,
7 Switzerland), as described previously (11) . Briefly, during 6 seconds subjects were
8 encouraged to exert the highest strength against a fixed bar positioned across the
9 shoulders in the lowest time. The best of three attempts, with 5 minutes resting periods
10 in between, was recorded. Maximal isometric force (N) was determined as the highest
11 value of the force produced. Maximal isometric force per kilogram body weight was
12 also assessed.

13

14 *Anaerobic capacity*

15 A three hundred meter running test was used to estimate the anaerobic capacity. The
16 anaerobic capacity is the first determinant of performance in maximal all-out efforts
17 eliciting exhaustion between 30 and 60 seconds (9). The test was performed in a 400m
18 track, and timings were measured manually with a digital stopwatch. Subjects were
19 asked to run the 300m as fast as possible.

20

21 *Running speed test*

22 Following an individual warm up, subjects performed three maximal indoor short sprint
23 trials, each separated by at least 5 minutes. The time needed to cover 30 meters was
24 measured with photoelectric cells (General ASDE, Valencia, Spain). The timer is
25 automatically activated when the subject crosses the first cell, every 5-m thereafter. The

1 subjects were encouraged to run as fast as possible. A standing start was used and the
2 best of three trials was selected as the representative value of this test (50).

3

4 *Hormonal assays*

5 Blood samples were obtained at baseline and after nine weeks of training to determine
6 serum concentrations of osteocalcin, leptin, free testosterone and cortisol. All
7 concentrations were determined in duplicate by ELISA (ELx800 Universal Microplate
8 Reader, Biotek Instruments), using reagent kits from Nordic Bioscience Diagnostics
9 (Herlev, Denmark) for osteocalcin, Linco Research (St. Charles, Missouri, USA) for
10 leptin and Diagnostic Systems Laboratories (Webster, Tex., USA) for free testosterone
11 and cortisol. Intra- and inter-assay variances were 6.7% and 6.7% for osteocalcin, 2.6%
12 and 3.7% for leptin, 6.5% and 3.1% for free testosterone, and 5.9 and 8.7% for cortisol,
13 respectively. 17β -estradiol was measured by a competitive electrochemiluminescence
14 immunoassay (ECLIA) intended for use on Modular Analytics analyzer E170 using E2
15 reagents (Roche/Hitachi, 03000079122, Indianapolis, USA). Results were determined
16 via a calibration curve being the analytical sensitivity 18.4 pmol/L.

17 The free testosterone/cortisol molar ratio (FTCR) was calculated as an indication
18 of the balance between anabolic and catabolic activity within the tissues, and calculated
19 as free testosterone in nmol/L and cortisol in μ mol/L) as previously reported (2).

20

21 *Muscle biopsies*

22 Needle muscle biopsies were obtained from the middle section of the vastus lateralis
23 muscle under local anaesthesia without suction, but with mild pressure on the lateral
24 aspect of the thigh. Biopsies before and after the training period were obtained from 48
25 of the subjects (22 from TG and 26 from the CG). The muscle samples were

1 immediately mounted with Tissue-Tek and frozen in isopentane cooled with liquid
2 nitrogen, and stored at -80°C . MHC analyses were performed on the muscle biopsies
3 using sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as
4 reported by Larsson et al (28). From each biopsy 20-40 serial cross sections ($10\mu\text{m}$)
5 were cut and placed in 200-500 μL of lysing buffer and heated for 3 min at 90°C .
6 Between 2 and 12 μL of the myosin-containing samples were loaded on a SDS-PAGE.
7 Gels were run at 70 V for 43 h at 4°C . Subsequently, the gels were Coomassie stained
8 and MHC isoform bands (I, IIa, IIx) were determined based on known migration
9 patterns and quantified with the image analysis software Quantity One[©] from Bio-Rad
10 Laboratories (Hemel Hempstead Hertfordshire, UK).

11

12 *Statistical analyses*

13 Repeated measures ANOVA was used to determine changes between baseline and the
14 end of the training program, a group by sex interaction was included in this analysis.
15 Pearson correlation coefficients were determined to evaluate relationships among
16 variables of body composition, hormones, and physical performance tests. All statistical
17 tests were two-tailed. Data are expressed as mean \pm standard deviation of the mean (SD)
18 and significance was set at the $P\leq 0.05$ level.

19

20 **Results**

21 *Cross-sectional analysis*

22 In the whole groups of subjects, the basal serum concentration of osteocalcin was
23 positively correlated with whole body BMC ($r=0.31$; $p<0.05$) (Fig 1), whole body lean
24 mass ($r=0.43$; $p<0.01$) (Fig 1), lower extremities BMC ($r=0.36$; $p<0.01$), BMD ($r=0.29$;
25 $p<0.05$), and lean mass ($r=0.42$; $p<0.01$), inclined leg press 1RM ($r=0.27$; $p<0.05$), leg

1 extension 1RM ($r=0.27$; $p<0.05$), leg curl 1RM ($r=0.35$; $p<0.01$), and serum free
2 testosterone concentration ($r=0.41$; $p<0.01$) (Fig. 2). In contrast, osteocalcin
3 concentration was negatively correlated with leptin serum concentration ($r=-0.37$;
4 $p<0.01$) (Fig. 2), cortisol serum concentration ($r=-0.39$; $p<0.01$) (Fig. 2), body fat mass
5 ($r=-0.31$; $p<0.05$) (Fig. 1), the percentage of body fat mass ($r=-0.44$; $p<0.01$) (Fig. 1)
6 and 30m running time ($r=-0.43$; $p<0.01$).

7 Serum leptin concentration correlated with the percentage of MHC IIX in men
8 ($r=0.36$, $P<0.05$, $n=31$).

9

10 *Effects of strength training on performance*

11 Control and training groups were comparable at the beginning of the study. Both
12 genders experienced improvements with training in dynamic strength (1RM) and
13 maximal isometric force (MVC) (Table 3, Fig. 3A). There was a large variation in the
14 relative improvement in dynamic strength between exercises ranging from 16 to 92%,
15 but dynamic strength was enhanced similarly in men and women (Fig 3A). However, a
16 gender dimorphism was observed in the improvement of MVC (+17.2% and +14.0%, in
17 men and women, respectively, $p<0.01$; time x sex interaction $p<0.01$). However, the
18 MVC per kg of lean mass in the lower extremities was increased similarly in both
19 genders with training (+8.3 and +7.4% in men and women respectively, $p<0.01$ and
20 $p<0.05$; group by time interaction $p<0.01$) (Fig. 3B).

21 Only the women from the training group improved significantly the thirty meters
22 running speed (30m) (time per sex interaction $p<0.05$, Table 3). Performance in the
23 300m running test was not significantly affected by training (group by time interaction
24 $p=0.83$; sex by group by time interaction $p=0.97$, Table 3).

25

1 *Hormonal responses to training*

2 A between sex comparison in serum hormone concentrations before and after training is
3 reported in Table 4. Women had higher serum cortisol, leptin and estradiol
4 concentrations than men. In turn, men had higher serum free testosterone and
5 osteocalcin concentrations than women (Table 4).

6 The basal serum concentrations of free testosterone, cortisol, the free
7 testosterone/cortisol ratio and 17β -estradiol were not affected by training (group by time
8 interaction $p=0.32$, $p=0.21$, $p=0.22$, and $p=0.96$, respectively, Table 4).

9 Serum leptin concentration was reduced with training (group by time interaction:
10 $p<0.05$, Table 4), but only in women (gender by time interaction in the training group:
11 $p=0.009$) (Fig. 2a). This difference remained significant after accounting for the
12 percentage of body fat as a co-variable.

13 Serum osteocalcin concentration was increased after strength training by 45 and
14 27% in men and women, respectively (ANOVA time effect: $p<0.001$, Table 5), while it
15 remained unchanged in the control subjects (group by time interaction $p<0.01$, Table 4)
16 (Fig. 2b). The gender differences in the osteocalcin response to training did not reach
17 statistical significance (gender x time interaction: $p=0.15$, power=0.30, SE=0.09).

18

19 *Fat and lean body mass*

20 Fat mass was not significantly altered by strength training. However, lean body mass
21 was increased by 1.6 and 1.4% in men and women from the TG, respectively (ANOVA
22 time effect: $p<0.001$, Table 5), without group by time effects ($p=0.37$, Table 5), nor sex
23 by group by time effects ($p=0.50$, Table 5). The increase in lean body mass with
24 training occurred principally in the lower extremities where it increased by 4.5 and
25 5.3% in men and women from the TGs, respectively (Table 5). Although, the lean mass

1 of the lower extremities was increased by 2.0 and 2.8% in men and women from the
2 CG, respectively (Table 5), a group by time interaction was also found (ANOVA group
3 by time effect $p < 0.03$, Table 5), meaning that the enhancement in lean mass was
4 significantly greater in TG compared to the CG.

5

6 *Effects on bone mass*

7 Whole body BMC (WBBMC) was increased with training by 0.78% ($p < 0.001$, Table
8 5), while it remained unchanged in the control group (group by time interaction: $p < 0.05$,
9 Table 5). The response was similar in men and women (gender x time interaction in the
10 training group $p = 0.68$, Table 5). In contrast, whole body BMD was only increased in
11 the men from the TG (from 1.25 ± 0.07 to 1.26 ± 0.07 ; $\text{gr} \cdot \text{cm}^2$ $p < 0.01$, Table 5),
12 revealing a significant group by time by gender interaction ($p < 0.02$, Table 5).

13 Lumbar spine (L1+L2+L3+L4) BMC was increased with training similarly in
14 both groups (2.0 and 1.2%, in men and women, respectively, $p < 0.001$, Table 5).
15 However, the group per time interaction did not reach statistical significance ($p = 0.21$,
16 Table 5) and there was no a significant gender effect. Although overall effects on
17 lumbar spine BMD were not significant, there was a trend for a group x time interaction
18 in the training group ($p = 0.07$, Table 5). This effect was due to the 2.2% increase in
19 lumbar BMD observed in men from the TG ($p < 0.01$, Table 4).

20 There was no significant effects in the BMC and BMD of the hip regions except
21 for femoral neck BMC, which increased with training (group x time interaction: $p < 0.05$,
22 Table 5), without significant differences in the responses between genders (gender x
23 time interaction in the training group: $p = 0.31$, Table 5).

24

1 *Myosin heavy-chain isoform distribution*

2 Men and women had a similar MHC distribution prior to strength training (Table 6).
3 Strength training in men resulted in an increased proportion of MHC type IIa (+22%;
4 ANOVA time effect: $p < 0.01$) and a reduction in the amount of MHC type I (-9.22%;
5 ANOVA time effect: $p < 0.02$) and type IIx (- 89% $p < 0.05$). No significant changes were
6 observed in women (Table 5) (Fig. 4), due to insufficient statistical power ($n=6$).

7

8

9 *Relationships between changes in body composition, physical performance and*
10 *hormonal concentrations.*

11 In the whole group of subjects there were correlations between the changes in
12 osteocalcin and the changes in lower extremities lean mass ($r=0.31$, $n=62$, $p < 0.05$) and
13 the changes in half squat 1RM ($r=0.27$, $n=59$, $p < 0.05$). In the whole female group, the
14 changes in osteocalcin correlated with the changes in: serum free testosterone ($r=0.57$,
15 $n=23$, $p < 0.05$), whole body lean mass ($r=0.48$, $n=22$, $p < 0.05$), lower extremities lean
16 mass ($r=0.42$, $n=22$, $P < 0.05$) and leg press 1RM ($r=0.46$, $n=20$, $P < 0.05$).

17 There was no relationship between the changes in osteocalcin and neither the
18 changes in body composition nor performance with training. The changes in serum
19 leptin concentration with training correlated positively with the changes body fat mass
20 and percentage of body fat ($r=0.49$ and 0.45 , respectively, $n=25$, both $p < 0.05$) and
21 negatively with the changes in serum cortisol ($r=-0.41$, $n=25$, $P < 0.05$). The association
22 between leptin changes and fat mass changes was statistically significant in men
23 ($r=0.47$, $n=18$, $p=0.05$) but not in women ($r=0.46$, $n=8$, $p=0.25$). The gain of lean mass
24 in the lower extremities correlated with the gain in BMC in this region ($r=0.45$, $n=27$,
25 $p < 0.05$).

1 In the training group, the change in osteocalcin tended to be positively
2 associated with the change in leptin in men ($r=0.46$, $n=18$, $p=0.056$) and inversely in
3 women ($r=-0.57$, $n=8$, $p=0.14$).

4

5 **Discussion**

6 It has been shown in rodents that osteocalcin reduces fat mass and enhances insulin
7 sensitivity (16, 29). The present investigation shows: (a) osteocalcin serum
8 concentration is positively associated with bone mass and density, lean body mass,
9 muscle strength and power; (b) osteocalcin is positively associated with free
10 testosterone and men have greater circulating levels of osteocalcin than women; (c)
11 osteocalcin is negatively associated with serum cortisol and leptin concentrations, fat
12 mass, and the percentage of body fat; (d) men and women increase their muscle mass
13 and muscle strength similarly in response to strength training; (e) serum osteocalcin
14 concentration is increased similarly in men and women submitted to nine weeks of
15 strength training combined with plyometric exercises; (f) there is a gender dimorphism
16 in the serum leptin response to strength training such that serum leptin concentration is
17 reduced with strength training in women but not in men; (g) despite a marked change in
18 osteocalcin there was no significant effects of fat mass; (h) in women, the changes in
19 osteocalcin are associated to changes in serum free testosterone, lean mass and strength.

20

21 *Performance enhancement with strength training is similar in men and women*

22 The effect of the training program on performance was rather similar in both genders. In
23 agreement with previous studies, men and women showed similar relative
24 improvements in maximal dynamic force (1RM) (30, 39, 42). However, men improved
25 significantly more MVC than women, although the gender effect was small. In contrast,

1 running speed in 30m was improved only in women. These effects were in part
2 explained by a similar degree (4-5%) of muscle hypertrophy in the lower extremities,
3 which was also similar in men and women, in agreement with previous studies (12, 24,
4 30, 31, 43, 52).

5

6 *Strength training reduces basal serum leptin concentration even in absence of changes*
7 *in fat mass, but only in women.*

8 In agreement with our results, Ryan et al. (39) and Walts et al. (52) reported no changes
9 in fat mass (39), thigh subcutaneous fat (assessed by magnetic resonance imaging) or
10 intermuscular fat in young (39) and aged (50-85 years) men and women who endured a
11 strength training program lasting 6 months (39) or 10 weeks (52). In young men,
12 however, we have also observed a small reduction in fat mass with only six weeks of
13 strength training but using a harder exercise program (4). Lemmer et al. reported that
14 there is a gender dimorphism in the effects of strength training on resting metabolic rate
15 (RMR), which increases in trained young men but not in women, even after adjusting
16 RMR for fat-free mass (31). However, no change in RMR has been reported with
17 strength training in other studies (8, 46, 47). Moreover, despite the elevation of RMR
18 reported by Lemmer et al. strength training did not affect fat mass neither in men nor in
19 women in their study (31).

20 In agreement with our previous study (4) and others (25), no changes in basal
21 serum leptin concentration were observed in men. However, leptin concentration
22 diminished by 14% in the females of the TG, and this effect remained significant even
23 after accounting for differences in body fat. This finding concurs with a 17% decrease
24 in fasting serum leptin levels after 12 weeks of aerobic training in women without
25 significant changes in men, despite the fact that fat mass was not altered after training in

1 either group (23). Thus, for a given fat mass young women have less circulating leptin
2 after strength training. This finding is compatible with enhanced leptin sensitivity after
3 strength training in women.

4 However, the reduction in fat mass only explained 21% of the reduction in
5 serum leptin concentration with strength training, implying that, in women, exercise *per*
6 *se* contributes to reduce serum leptin levels by mechanisms additional to the simple
7 reduction in fat mass. A similar gender dimorphism has been reported in response to a
8 6-month hypocaloric diet eliciting similar losses in fat mass percentage (-13% and -
9 16%, in men and women, respectively), but greater relative decline in circulating leptin
10 in women than men (-45% and -21%, respectively), even after accounting for the
11 changes in fat mass (35).

12 In agreement with animal studies showing that leptin has a negative influence on
13 bone mass (14), in women there was a trend for a negative association between the
14 changes in serum osteocalcin and leptin. However, in men osteocalcin and leptin
15 changed in the same direction. The latter could indicate that the interaction between
16 osteocalcin and leptin may be modulated by sexual hormones. In fact, a clear
17 association between free testosterone changes and osteocalcin was observed in women.
18 Serum testosterone, 17 β -estradiol and cortisol are hormones that may fluctuate in
19 response to strength training (3, 21, 27, 42), and may influence bone metabolism (6) and
20 leptin concentrations in plasma (7, 32-34, 41, 51, 54). However, in the present study
21 these hormones did not change significantly with strength training.

22

23 *Osteocalcin response to strength training and fat mass*

24 Studies with rodents indicate that osteocalcin reduces fat mass (16, 29). In agreement,
25 our cross-sectional data also show a negative correlation between osteocalcin and fat

1 mass, the percentage of body fat and leptin concentration in serum. However, our
2 longitudinal data show that in exercising humans fed *ad libitum* a marked (but
3 physiological) increase in osteocalcin concentration is not associated to a reduction of
4 fat mass, regardless of gender. In agreement, no significant correlations were observed
5 between changes in osteocalcin and changes visceral fat in eleven perimenopausal obese
6 women submitted to hypocaloric diet combined with strength training (15). It remains to
7 be determined if a higher elevation (or pharmacological levels) of osteocalcin could
8 reduce fat mass in humans.

9

10 *The short-term osteogenic response to strength training is similar in young men and*
11 *women.*

12 Our study shows that even nine weeks of strength training combined with jumping
13 exercise is long enough to elicit a small, but significant increase in bone mineral
14 content, which magnitude and regional distribution is rather similar in young adult men
15 and women. In addition, the present investigation shows for the first time that the short-
16 term osteogenic response to exercise is similar in young adult men and women as
17 reflected by similar increases in osteocalcin serum concentration and similar
18 enhancements of whole body and lumbar spine bone mineral content. These findings
19 contrast with the marked gender dimorphism observed in adolescents (peri- to
20 postpubertal), who participated in an eight months in-school intervention, which
21 consisted on 10 min of jumping activity in place of regular physical education warm up
22 (53).

23 No single study had previously examined the osteogenic responses to the same
24 strength training program in men and women, with comparable control groups. The few
25 studies published until now lacked of appropriate control groups (39). Ryan et al.

1 reported, in 10 men and 7 women (age range: 20-29 years), that after 6 months of
2 training 3 times a week with moderate loads (12-15RM), whole body BMC was
3 improved only in young men, however there was no gender effect in the ANOVA test,
4 implying that this finding provides only little, if any, evidence in favour of a greater
5 osteogenic responsiveness in men. The latter basically concurs with the present
6 investigation, with the difference that the effects here reported were achieved in shorter
7 time and with a more intense strength training program supplemented with jumps. We
8 have, however, observed a trend for greater improvements in BMD in men than women.
9 It remains to be determined if a longer intervention would lead to greater enhancement
10 of BMD in men than women.

11 In contrast with our results, no significant effects of short-term strength training
12 programs (without jumping exercises) in young women have been reported (13, 36).
13 This discrepancy is likely attributable to the differences in the training program and
14 highlights the importance of including jumping or other high-impact exercises in the
15 training program.

16

17 *The enhancement of bone mass with strength training is associated to muscle*
18 *hypertrophy and to the increase in basal serum osteocalcin concentration.*

19 This study shows that the change in osteocalcin concentration is positively associated to
20 the level of muscle hypertrophy elicited by the strength training program. This may just
21 reflect the concurrent mechanical stimulation of bones and muscle fibres by the strength
22 and jumping exercises. In agreement with our hypothesis, the gain in lower extremities
23 lean mass explained 22% of the variance in the gain of whole body BMC. This finding
24 agrees with previous studies with transgenic animals showing that phenotypes of
25 increased muscle mass also show enhanced bone mass (22). In humans, a twin study

1 that included 56 monozygotic and 56 dizygotic female pairs of twins of mean age of 45
2 years (range 24–67) concluded that genetic factors accounted for 60–80% of the
3 variance in hip BMD and 60–80% of the variance in lean mass and more than 50% of
4 their covariance (40). The latter was interpreted as an indication that the association
5 between greater muscle mass and greater BMD is likely to be determined by genes
6 regulating size (40). However, latter studies on humans have shown an association
7 between the increase in muscle mass and the gain in bone mass (49).

8

9 In summary, this study shows that osteocalcin serum concentration is positively
10 associated with bone mass and density, lean body mass, muscle strength and free
11 testosterone; whilst osteocalcin is negatively associated with serum cortisol and leptin
12 concentrations, fat mass, and the percentage of body fat. In addition, we have shown
13 that basal serum osteocalcin concentration increases similarly in men and women
14 submitted to strength training combined with plyometric exercises. However, basal
15 serum leptin concentration was only reduced in women, implying a gender dimorphism
16 in the leptin response to strength training. This disparity in the leptin response to
17 strength training was not explainable by differences in the fat mass, free testosterone,
18 17β -estradiol or cortisol responses to strength training. Finally, our longitudinal data
19 show that in exercising humans fed *ad libitum* an increase in osteocalcin concentration
20 is not associated to a reduction of fat mass.

1 **Acknowledgements**

2 This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia
3 (BFI2003-09638, BFU2006-13784 and FEDER) and the Gobierno de Canarias
4 (PI2005/177). Special thanks are given to José Navarro de Turo for his excellent
5 technical assistance and to all subjects who volunteered for these experiments.

6

References

1. **Abe T, DeHoyos DV, Pollock ML, and 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* 81: 174-180, 2000.
2. **Adlercreutz H, Harkonen M, Kuoppasalmi K, Naveri H, Huhtaniemi I, Tikkanen H, Remes K, Dessypris A, and Karvonen J.** Effect of training on plasma anabolic and catabolic steroid hormones and their response during physical exercise. *Int J Sports Med* 7 Suppl 1: 27-28, 1986.
3. **Ahtiainen JP, Pakarinen A, Alen M, Kraemer WJ, and Hakkinen K.** Muscle hypertrophy, hormonal adaptations and strength development during strength training in strength-trained and untrained men. *Eur J Appl Physiol* 89: 555-563, 2003.
4. **Ara I, Perez-Gomez J, Vicente-Rodriguez G, Chavarren J, Dorado C, and Calbet JA.** Serum free testosterone, leptin and soluble leptin receptor changes in a 6-week strength-training programme. *Br J Nutr* 96: 1053-1059, 2006.
5. **Blain H, Vuillemin A, Guillemin F, Durant R, Hanesse B, de Talance N, Doucet B, and Jeandel C.** Serum leptin level is a predictor of bone mineral density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1030-1035, 2002.
6. **Borer KT.** Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. *Sports Med* 35: 779-830, 2005.
7. **Brann DW, De Sevilla L, Zamorano PL, and Mahesh VB.** Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* 64: 659-663, 1999.
8. **Broeder CE, Burrhus KA, Svanevik LS, and Wilmore JH.** The effects of either high-intensity resistance or endurance training on resting metabolic rate. *Am J Clin Nutr* 55: 802-810, 1992.
9. **Calbet JA, De Paz JA, Garatachea N, Cabeza de Vaca S, and Chavarren J.** Anaerobic energy provision does not limit Wingate exercise performance in endurance-trained cyclists. *J Appl Physiol* 94: 668-676, 2003.
10. **Calbet JA, Dorado C, Diaz-Herrera P, and Rodriguez-Rodriguez LP.** High femoral bone mineral content and density in male football (soccer) players. *Med Sci Sports Exerc* 33: 1682-1687, 2001.
11. **Calbet JA, Moysi JS, Dorado C, and Rodriguez LP.** Bone mineral content and density in professional tennis players. *Calcif Tissue Int* 62: 491-496, 1998.
12. **Cureton KJ, Collins MA, Hill DW, and McElhannon FM, Jr.** Muscle hypertrophy in men and women. *Med Sci Sports Exerc* 20: 338-344, 1988.
13. **Chilibeck PD, Calder A, Sale DG, and Webber CE.** Twenty weeks of weight training increases lean tissue mass but not bone mineral mass or density in healthy, active young women. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 1180-1185, 1996.
14. **Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, and Karsenty G.** Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434: 514-520, 2005.
15. **Fernandez-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gomez-Ambrosi J, Moreno-Navarrete JM, Fruhbeck G, Martinez C, Idoate F, Salvador J, Forga L, Ricart W, and Ibanez J.** The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab* 2008.
16. **Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, and Ducy P.** Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5266-5270, 2008.

17. **Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Catalan V, and Fruhbeck G.** The bone-adipose axis in obesity and weight loss. *Obes Surg* 18: 1134-1143, 2008.
18. **Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, and Reseland JE.** Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 85: 825-836, 2002.
19. **Guadalupe-Grau A, Fuentes T, Guerra B, and Calbet JAL.** Exercise and bone mass in adults. *Sports Med* In press, 2008.
20. **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.
21. **Hakkinen K, Kallinen M, Izquierdo M, Jokelainen K, Lassila H, Malkia E, Kraemer WJ, Newton RU, and Alen M.** Changes in agonist-antagonist EMG, muscle CSA, and force during strength training in middle-aged and older people. *J Appl Physiol* 84: 1341-1349, 1998.
22. **Hamrick MW, Samaddar T, Pennington C, and McCormick J.** Increased muscle mass with myostatin deficiency improves gains in bone strength with exercise. *J Bone Miner Res* 21: 477-483, 2006.
23. **Hickey MS, Houmard JA, Considine RV, Tyndall GL, Midgette JB, Gavigan KE, Weidner ML, McCammon MR, Israel RG, and Caro JF.** Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. *Am J Physiol* 272: E562-566, 1997.
24. **Ivey FM, Roth SM, Ferrell RE, Tracy BL, Lemmer JT, Hurlbut DE, Martel GF, Siegel EL, Fozard JL, Jeffrey Metter E, Fleg JL, and Hurley BF.** Effects of age, gender, and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: M641-648, 2000.
25. **Kanaley JA, Fenicchia LM, Miller CS, Ploutz-Snyder LL, Weinstock RS, Carhart R, and Azevedo JL, Jr.** Resting leptin responses to acute and chronic resistance training in type 2 diabetic men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1474-1480, 2001.
26. **Karsenty G.** Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* 4: 341-348, 2006.
27. **Kraemer WJ, and Ratamess NA.** Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med* 35: 339-361, 2005.
28. **Larsson B, Andersen JL, Kadi F, Bjork J, and Gerdle B.** 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, 2002.
29. **Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, and Karsenty G.** Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456-469, 2007.
30. **Lemmer JT, Hurlbut DE, Martel GF, Tracy BL, Ivey FM, Metter EJ, Fozard JL, Fleg JL, and Hurley BF.** Age and gender responses to strength training and detraining. *Med Sci Sports Exerc* 32: 1505-1512, 2000.
31. **Lemmer JT, Ivey FM, Ryan AS, Martel GF, Hurlbut DE, Metter JE, Fozard JL, Fleg JL, and Hurley BF.** Effect of strength training on resting metabolic rate and physical activity: age and gender comparisons. *Med Sci Sports Exerc* 33: 532-541, 2001.
32. **Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, Lehtonen A, Tilvis R, Tuomilehto J, Koulu M, and Huupponen R.** Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3243-3246, 1998.

33. **Mannucci E, Ognibene A, Becorpi A, Cremasco F, Pellegrini S, Ottanelli S, Rizzello SM, Massi G, Messeri G, and Rotella CM.** Relationship between leptin and oestrogens in healthy women. *Eur J Endocrinol* 139: 198-201, 1998.
34. **Miell JP, Englaro P, and Blum WF.** Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res* 28: 704-707, 1996.
35. **Nicklas BJ, Katzell LI, Ryan AS, Dennis KE, and Goldberg AP.** Gender differences in the response of plasma leptin concentrations to weight loss in obese older individuals. *Obes Res* 5: 62-68, 1997.
36. **Nindl BC, Harman EA, Marx JO, Gotshalk LA, Frykman PN, Lammi E, Palmer C, and Kraemer WJ.** Regional body composition changes in women after 6 months of periodized physical training. *J Appl Physiol* 88: 2251-2259, 2000.
37. **Pasco JA, Henry MJ, Kotowicz MA, Collier GR, Ball MJ, Ugoni AM, and Nicholson GC.** Serum leptin levels are associated with bone mass in nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1884-1887, 2001.
38. **Rubin CT, and Lanyon LE.** Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am* 66: 397-402, 1984.
39. **Ryan AS, Ivey FM, Hurlbut DE, Martel GF, Lemmer JT, Sorkin JD, Metter EJ, Fleg JL, and Hurley BF.** Regional bone mineral density after resistive training in young and older men and women. *Scand J Med Sci Sports* 14: 16-23, 2004.
40. **Seeman E, Hopper JL, Young NR, Formica C, Goss P, and Tsalamandris C.** Do genetic factors explain associations between muscle strength, lean mass, and bone density? A twin study. *Am J Physiol* 270: E320-327, 1996.
41. **Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N, and Mori M.** Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154: 285-292, 1997.
42. **Staron RS, Karapondo DL, Kraemer WJ, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, Hagerman FC, and Hikida RS.** Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J Appl Physiol* 76: 1247-1255, 1994.
43. **Staron RS, Leonardi MJ, Karapondo DL, Malicky ES, Falkel JE, Hagerman FC, and Hikida RS.** Strength and skeletal muscle adaptations in heavy-resistance-trained women after detraining and retraining. *J Appl Physiol* 70: 631-640, 1991.
44. **Takeda S, and Karsenty G.** Molecular bases of the sympathetic regulation of bone mass. *Bone* 42: 837-840, 2008.
45. **Thomas T, Burguera B, Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, and Khosla S.** Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone* 29: 114-120, 2001.
46. **Van Etten LM, Westerterp KR, and Verstappen FT.** Effect of weight-training on energy expenditure and substrate utilization during sleep. *Med Sci Sports Exerc* 27: 188-193, 1995.
47. **Van Etten LM, Westerterp KR, Verstappen FT, Boon BJ, and Saris WH.** Effect of an 18-wk weight-training program on energy expenditure and physical activity. *J Appl Physiol* 82: 298-304, 1997.
48. **Vicente-Rodriguez G.** How does exercise affect bone development during growth? *Sports Med* 36: 561-569, 2006.
49. **Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Dorado C, and Calbet JA.** Muscular development and physical activity as major determinants of femoral bone mass acquisition during growth. *Br J Sports Med* 39: 611-616, 2005.

50. **Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Serrano-Sanchez JA, Dorado C, and Calbet JA.** High femoral bone mineral density accretion in prepubertal soccer players. *Med Sci Sports Exerc* 36: 1789-1795, 2004.
51. **Wabitsch M, Blum WF, Muehe R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, and Hauner H.** Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 100: 808-813, 1997.
52. **Waltz CT, Hanson ED, Delmonico MJ, Yao L, Wang MQ, and Hurley BF.** Do sex or race differences influence strength training effects on muscle or fat? *Med Sci Sports Exerc* 40: 669-676, 2008.
53. **Weeks BK, Young CM, and Beck BR.** Eight months of regular in-school jumping improves indices of bone strength in adolescent boys and Girls: the POWER PE study. *J Bone Miner Res* 23: 1002-1011, 2008.
54. **Yilmaz Z, Ilcol YO, and Golcu E.** Serum leptin and ghrelin levels in response to methylprednisolone injection in healthy dogs. *Res Vet Sci* 82: 187-194, 2007.

Figure legends

Figure 1. Relationship between serum osteocalcin concentration and whole body BMC, lean mass, fat mass, and percentage of body fat in forty men (black circles) and twenty-two women (white circles).

Figure 2. Relationship between serum osteocalcin concentration and the serum concentrations of leptin (n=63), cortisol (n=61) and free testosterone (n=59).

Figure 3. A Effects of strength training combined with jumps on 1 repetition maximum. ILP, inclined leg press; LE, leg extension; HS, half squat; LC, leg curl; % Δ 1RM, relative increases of 1 repetition maximum expressed as percentage. White bars control groups, grey bars training groups, hatched bars women, whole bars men. * P <0.01 group by time interaction. **B.** Changes in maximal isometric force per kilogram lower extremity lean mass (MIF/LLM) expressed in $\text{Kg.Kg lean mass}^{-1}$, after 9 weeks intervention period. CG, control group; TG, training group; Values are means \pm SEM; * p <0.01 before vs. after training.

Figure 4. Identification of the three bands corresponding to MHC isoforms I, IIa and IIx in muscle biopsies using sodium docedylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis.

Table 1. Subject's characteristics at the beginning of the study.

	Men (n=43)						Women (n=23)					
	Control Group			Training Group			Control Group			Training Group		
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD
Age (years)	24.6	±	2.4	23.13	±	2.2	23.7	±	2.7	22.3	±	2.7
Height (cm)	174.8	±	6.8 [#]	174.7	±	7.1 [#]	162.5	±	5.5	168.5	±	6.0 [*]
Weight (kg)	76.3	±	11.2 [#]	69.5	±	7.3 ^{*#}	58.9	±	6.2	61.7	±	4.8
BMI (kg·m ⁻²)	24.0	±	3.6	22.8	±	2.0	22.3	±	2.1	21.7	±	1.2
%Fat mass	14.5	±	3.9 [#]	15.8	±	6.4 [#]	27.6	±	5.7	28.0	±	4.6

*P < 0.05 vs. the respective control subjects; [#]P < 0.05 males vs. females in the same group.

Table 2. Training program.

Week	Session	Weight lifting			Plyometric exercises		
		(% 1RM)	Sets	Repetitions	Drop Jump sets	Hurdles	Jumps
1	1	50-70-90	1-1-1	12-6-2	4 x 5 (40 cm)	4 x 5	40
	2	50-70-90	1-2-1	12-6-2	5 x 5 (40 cm)	5 x 5	50
	3	50-70-90	1-3-1	12-6-2	6 x 5 (40 cm)	6 x 5	60
2	1	50-70-90	1-3-1	12-6-2	5 x 5 (40 cm)	5 x 5	50
	2	50-70-90	1-3-2	12-8-3	6 x 5 (40 cm)	6 x 5	60
	3	50-70-90	1-3-1	12-8-2	7 x 5 (40 cm)	7 x 5	70
3	1	50-80-90	1-3-2	12-8-3	5 x 5 (50 cm)	5 x 5	50
	2	50-80-90	1-3-2	12-8-3	6 x 5 (50 cm)	6 x 5	60
	3	50-80-90	1-3-2	12-8-3	7 x 5 (50 cm)	7 x 5	70
4	1	50-70-90	1-3-1	12-6-2	6 x 5 (50 cm)	6 x 5	60
	2	50-70-90	1-2-1	12-8-2	7 x 5 (50 cm)	7 x 5	70
	3	50-70-90	1-3-1	12-10-2	8 x 5 (50 cm)	8 x 5	80
5	1	50-70-90	1-3-1	12-10-2	6 x 5 (60 cm)	6 x 5	60
	2	50-70-90	1-3-1	12-10-3	7 x 5 (60 cm)	7 x 5	70
	3	50-70-90	1-3-2	12-10-2	8 x 5 (60 cm)	8 x 5	80
6	1	50-80-90	1-3-1	12-8-3	7 x 5 (60 cm)	7 x 5	70
	2	50-80-90	1-3-2	12-8-3	8 x 5 (60 cm)	8 x 5	80
	3	50-80-90	1-3-2	12-8-3	9 x 5 (60 cm)	9 x 5	90
7	1	50-70-90	1-3-1	12-6-2	5 x 5 (70 cm)	5 x 5	50
	2	50-70-90	1-2-1	12-8-2	6 x 5 (70 cm)	6 x 5	60
	3	50-70-90	1-3-1	12-10-2	7 x 5 (70 cm)	7 x 5	70
8	1	50-70-90	1-3-1	12-3-2	9 x 5 (60 cm)	9 x 5	75
	2	50-70-90	1-3-1	12-10-3	10 x 5 (60 cm)	10 x 5	85
	3	50-70-90	1-3-2	12-10-2	11 x 5 (60 cm)	11 x 5	95
9	1	50-80-90	1-3-1	12-8-3	5 x 5 (80 cm)	5 x 5	50
	2	50-80-90	1-3-2	12-8-3	6 x 5 (70 cm)	6 x 5	60
	3	50-80-90	1-3-2	12-8-3	7 x 5 (70 cm)	7 x 5	70

Table 3. Physical performance before and after strength training combined with jumps.

Performance Test	Men						Women						Interaction group x time	Interaction group x time x gender
	Control group			Training group			Control group			Training group				
	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change		
ILP (kg)	253.9	265.9	4.7	211.8	360.3	70.1 *	155.9	160.0	2.6	119.4	228.7	91.5 *	p=0.001	p=0.08
SD	73.5	75.2		42.0	68.0		19.3	24.4		19.4	19.8			
LE (kg)	70.5	72.3	2.5	68.0	85.3	25.5 *	42.8	42.4	-0.9	47.5	62.3	31.1 *	p=0.001	p=0.85
SD	13.2	15.4		11.4	14.8		6.8	6.8		8.0	9.9			
HS (kg)	156.6	157.5	0.6	150.3	221.3	47.2 *	110.8	114.2	3.1	106.3	155.5	46.3 *	p=0.001	p=0.12
SD	36.6	34.2		28.5	39.0		18.3	20.0		17.7	19.6			
LC (kg)	58.4	58.5	0.2	55.4	64.0	15.5 *	32.8	32.3	-1.5	37.5	46.1	22.9 *	p=0.001	p=0.86
SD	10.0	10.4		8.2	8.4		6.3	6.4		5.3	4.4			
MIF (kg)	115.6	107.5	-7.0*	112.0	131.2	17.1 *	77.5	78.6	1.4	73.0	83.1	13.8 *	p=0.001	p=0.005
SD	23.8	23.7		20.4	26.7		12.2	16.5		8.7	8.7			
RMIF (kg)	1.52	1.41	-7.2**	1.61	1.85	14.9*	1.33	1.33	0.0	1.17	1.32	12.8*	p=0.001	p=0.03
SD	0.27	0.31		0.33	0.39		0.20	0.20		0.12	0.17			
MIF/LLM (kg)	11.40	10.41	-9.5**	12.15	13.53	11.36*	12.17	12.01	-1.31	10.8	11.67	8.1*	p=0.001	p=0.09
SD	2.06	2.23		2.71	2.92		1.79	2.19		1.2	1.32			
30m (s)	4.4	4.4	0.0	4.4	4.4	0.0	5.0	5.1	2.0 *	4.8	4.7	-2.1 *	p=0.02	p=0.034
SD	0.2	0.2		0.2	0.1		0.2	0.2		0.2	0.1			
300m (s)	47.0	47.2	0.4	46.3	46.4	0.2	59.6	59.2	-0.7	55.3	54.8	-0.9	p=0.84	p=0.97
SD	2.8	3.0		2.1	2.6		3.7	3.8		2.6	3.1			

Values are mean \pm standard deviation. *P<0.05 pre vs post comparison. Inclined leg press (ILP) ; Leg extension (LE) ; Half squat (HS) ; Leg curl (LC) ; Maximal isometric force (MIF) ; Maximal isometric per kilogram body weight (RMIF) ; Maximal isometric force per lower limbs lean mass (MIF/LLM) ; 30m sprint test (30m) ; 300 m all-out test (300m). Values are presented as means \pm standard deviation.

Table 4. Serum hormones before and after strength training combined with jumps.

	Men						Women						Interaction group x time	Interaction group x time x gender
	Control group			Training group			Control group			Training group				
	Pre	Post	Change	Pre	Post	Change	Pre	Post	Change	Pre	Post	Change		
Free testosterone (pg/mL)	21.1	19.6	-7.1	24.0	25.3	5.4	5.0 &	4.9	-2.0	5.4 &	5.8	7.4	p=0.32	p=0.51
SD	8.9	6.6		14.3	11.5		1.8	1.9		2.2	3.5			
Cortisol (mg/dL)	29.1	28.4	-2.4	33.0	31.0	-6.0	39.7 &	40.5	2.0	36.9	33.3	-9.7	p=0.21	p=0.49
SD	10.9	6.9		8.7	9.9		8.0	9.4		13.2	8.2			
FTCR	0.11	0.10	-9.1	0.11	0.12	9.1	0.02 &	0.02	0.0	0.02 &	0.02	0.0	p=0.22	p=0.29
SD	0.04	0.03		0.06	0.05		0.007	0.007		0.009	0.01			
Leptin (ng/mL)	3.0	2.9	-3.3	2.7	2.3	-4.8	13.7 &	15.5	13.1	13.6 &	11.7	-14.0	p=0.02	p=0.05
SD	2.5	2.0		1.4	1.1		6.8	7.7		6.1	6.0			
Estradiol (pg/mL)	21.5	21.3	-0.9	25.5	23.4	-8.2	62.5 &	49.1	-21.5	80.6 &	68.2	15.4	p=0.96	p=0.89
SD	16.2	15.5		15.8	11.8		66.5	41.3		57.6	82.0			
Osteocalcin (ng/ml)	31.9	31.5	-1.2	23.5	34.0	44.7*	17.7 &	18.8	6.2	20.3 &	25.8	27.1*	p=0.007	p=0.24
SD	14.0	11.5		7.1	11.4		4.4	7.1		8.9	11.0	14.0		

Values are mean \pm standard deviation. Free testosterone cortisol ratio (FTCR). *p<0.05 pre vs post comparison. & p<0.05 compared to men (same time point).

Table 5. Body composition before and after strength training combined with jumps.

DXA Measurement	Men						Women						Interaction group x time	Interaction group x time x gender
	Control group			Training group			Control group			Training group				
	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change		
Whole body														
BMC (gr)	2986	2994	0.3	2903	2921	0.6*	2207	2208	0.0	2418	2441	1.0 *	p=0.018	p=0.38
SD	327	317		269	266		269	280		267	271			
BMD (gr/cm ²)	1.24	1.24	0.0	1.25	1.26	0.8 *	1.11	1.12	0.9*	1.15	1.15	0.0	p=0.97	p=0.017
SD	0.07	0.07		0.07	0.07		0.08	0.08		0.08	0.08			
LM (gr)	60669	61087	0.7	56397	57330	1.6*	40025	40552	1.3	42172	42774	1.4*	p=0.37	p=0.50
SD	5725.6	5683.4		5199.6	5751.8		3650.6	3706.8		1661.0	2420.8			
FM (gr)	12690.6	12827.3	1.1	10244.3	10334.4	0.9	16680.2	16200	-2.8	17240.3	16809.8	-2.5	p=0.99	p=0.89
SD	6572.1	6301.7		3330.7	2829.5		3900.2	3840.0		4656.0	4086.6			
FM (%)	15.8	16.0	1.2	14.5	14.5	0.0	28.0	27.2	-2.8	27.6	26.9	-2.5	p=0.97	p=0.75
SD	6.4	6.0		3.9	3.1		4.6	4.2		5.7	5.1			
Lumbar Spine														
BMC (gr)	74.3	74.4	0.1	73.2	74.7	2.0 *	59.2	59.6	0.7	67.4	68.2	1.2	p=0.21	p=0.49
SD	8.2	7.8		4.33	10.9		9.2	9.0		8.1	7.7			
BMD (gr/cm ²)	1.09	1.10	0.0	1.10	1.12	2.7*	1.05	1.05	0.0	1.12	1.12	0.0	p=0.25	p=0.13
SD	0.08	0.08	0.9	0.12	0.11		0.13	0.14		0.09	0.09			
Lower limbs														
BMC (gr)	639.8	644.4	0.7*	600.6	604.6	0.6*	436.0	436.2	0.0	488.6	491.2	0.5	p=0.66	p=0.50
SD	86.2	85.8		66.1	65.6		59.2	61.3		56.6	57.7			
BMD (gr/cm ²)	1.5	1.5	0.0	1.5	1.5	0.0	1.2	1.2	0.0	1.3	1.3	0.0	p=0.72	p=0.56
SD	0.1	0.1		0.1	0.1		0.1	0.1		0.1	0.1			
LM (gr)	10163.3	10374	2.1*	9307	9725	4.5*	6358	6547.4	2.9*	6715	7071	5.3*	p=0.03	p=0.94
SD	1166.3	1120.5		1094.8	1153.3		641.5	680.4		384.5	556.6			
Hip														
Femoral neck BMC	6.3	6.2	-1.6	6.3	6.3	0.0	4.8	4.7	-2.1	5.0	5.1	2.0*	p=0.05	p=0.31
SD	0.8	0.8		0.5	0.5		0.7	0.7		0.5	0.5			
Femoral neck BMD	1.07	1.06	-1.0	1.08	1.06	-1.8	0.93	0.93	0.0	1.01	1.00	-1.0	p=0.07	p=0.19
SD	0.14	0.14		0.08	0.09		0.11	0.11		0.12	0.12			
Ward's T BMD	0.96	0.95	-1.0	0.91	0.91	0.0	0.86	0.85	-1.1	1.00	0.97	-3.0	p=0.58	p=0.35
SD	0.16	0.16		0.09	0.09		0.12	0.14		0.18	0.16			
Throc BMD	0.88	0.89	1.1	0.90	0.89	-1.1	0.78	0.78	0.0	0.81	0.81	0.0	p=0.13	p=0.54
SD	0.09	0.09		0.06	0.08		0.11	0.11		0.12	0.12			
InterThro BMD	1.35	1.36	0.7	1.35	1.36	0.7	1.15	1.15	0.0	1.23	1.23	0.0	p=0.91	p=0.63
SD	0.15	0.14		0.11	0.11		0.15	0.15		0.13	0.13			

Values are mean ± standard deviation (SD). Bone mineral content (BMC): Bone mineral density (BMD); Lean mass (LM); Fat mass (FM). *P<0.05 pre vs post comparison.

Table 6. Vastus lateralis myosin heavy-chain isoform composition before and after strength training combined with jumps.

MHC	Males						Females						Interaction group x time	Interaction group x time x gender
	Control group (N=			Training group			Control group			Training group				
	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change	Pre	Post	% Change		
Type I	53.5	49.4	-7.6	57.2	51.9	-9.2*	58.8	56.1	-4.6	64.3	61.5	-4.3	p=0.83	p=0.86
SD	12.1	11.5		11.6	8.4		7.3	10.9		3.5	8.6			
Type IIa	40.3	45.8	13.6	39.0	47.6	21.3*	41.2	40.4	-1.9	33.6	36.2	7.7	p=0.33	p=0.98
SD	14.8	13.4		12.9	9.2		7.3	10.5		7.6	9.9			
Type IIx	5.7	5.2	-8.7	3.8	0.4	-89*	0.0	3.4		2.0	2.2	10	p=0.13	p=0.91
SD	9.5	10.6		6.4	0.9		0.0	8.1		5.0	5.4			

Values are mean ± standard deviation (SD). *P<0.05.

Fig. 1

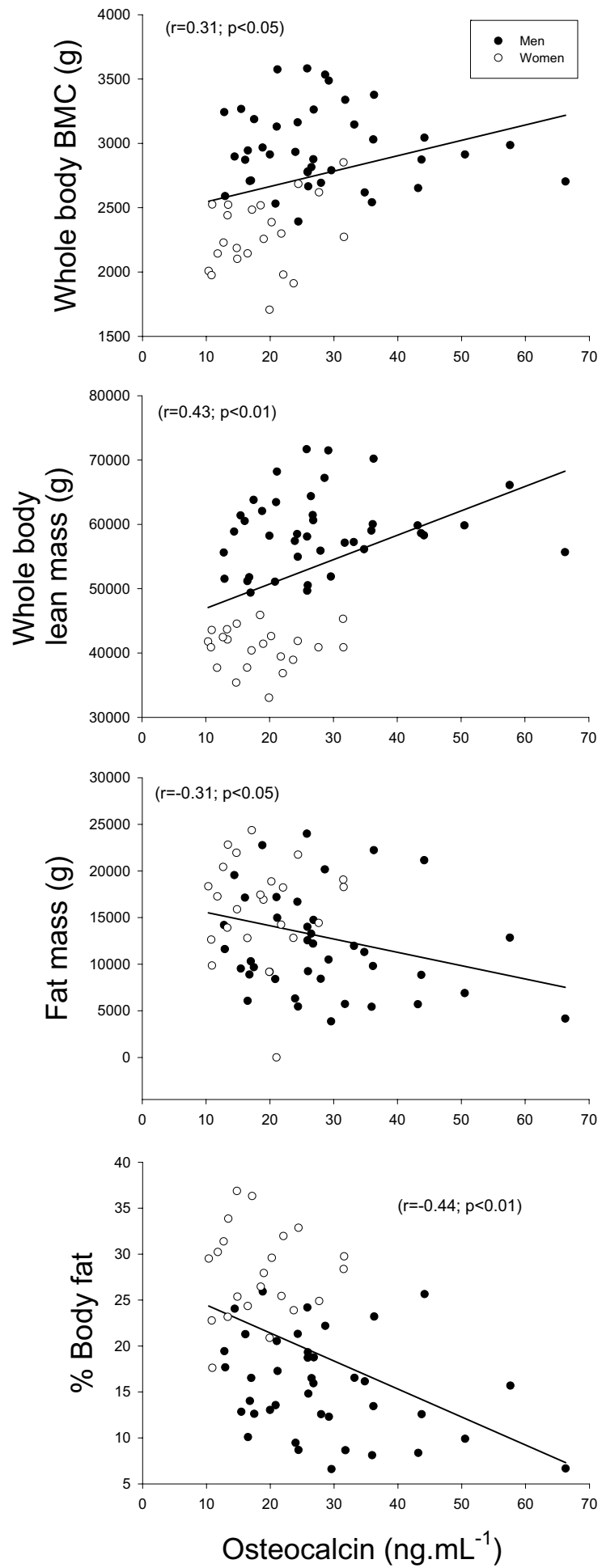
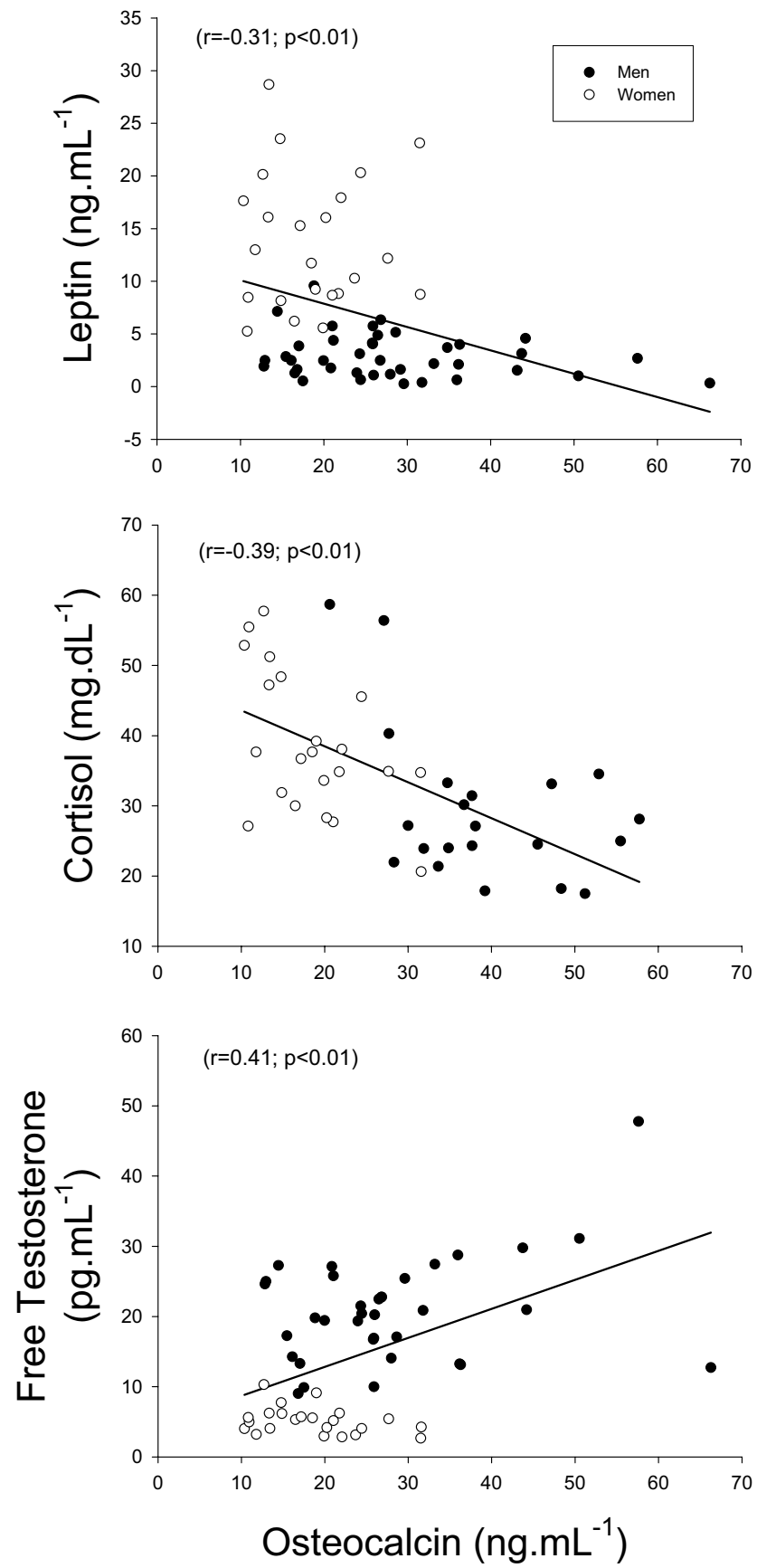


Fig. 2



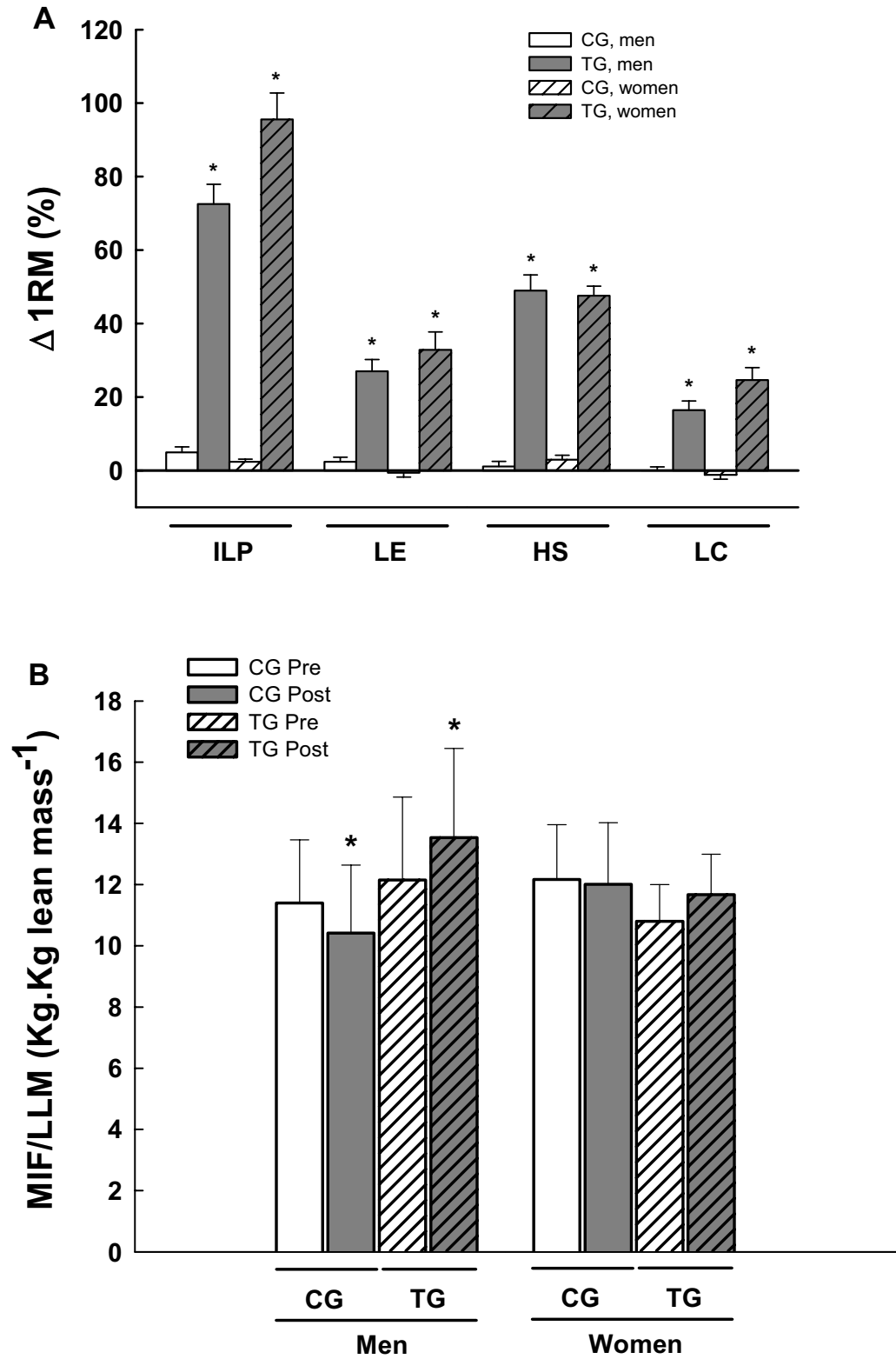
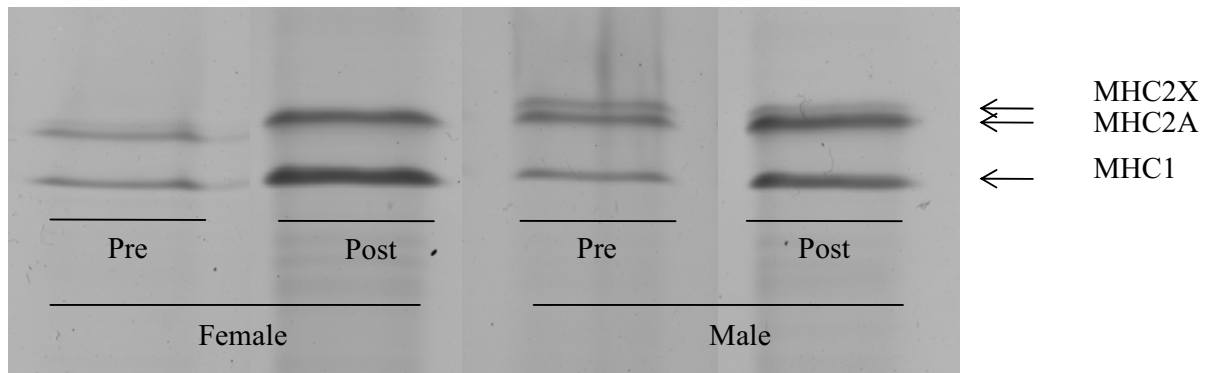


Fig. 3**Fig. 4.**

ESTUDIO III

Androgen receptor gene polymorphisms influence muscle mass and performance in humans.

Amelia Guadalupe-Grau¹, F. Germán Rodríguez-González^{2,3}, Cecilia Dorado¹, Teresa Fuentes¹, Jorge Pérez-Gómez⁴, Hugo Olmedillas¹, Safira Delgado-Guerra¹, Germán Vicente-Rodríguez^{5,6}, Ignacio Ara^{5,6}, Borja Guerra¹, Rafael Arteaga-Ortiz⁷, José A L Calbet¹, B. Nicolás Díaz-Chico^{2,3}.

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

²Department of Biochemistry and Physiology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

³ Canary Islands Cancer Research Institute (ICIC), Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

⁴ Department of Physical Education, University of Extremadura, Faculty of Sport Science, Avd Universidad s/n, Cáceres, 10071, Spain

⁵ GENUD (Growth, Exercise, NUtrition and Development) research group. University of Zaragoza.

⁶ Faculty of Health and Sport Sciences. Department of Physiotherapy and Nursing. University of Zaragoza.

⁷ Department of Physics, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain

Running title: “Androgen receptors, muscle mass and performance”

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

1 **Abstract**

2 The exon-1 of the androgen receptor (AR) gene contains two length polymorphisms which
3 modify either the amount of AR protein inside the cell (GGN_n, polyglycine) or its
4 transcriptional activity (CAG_n, polyglutamine). Shorter CAG and/or GGN repeats provide
5 stronger androgen signalling, and vice versa. To test the hypothesis that CAG and GGN
6 repeat AR polymorphism affects muscle mass and performance in humans, the length of CAG
7 and GGN repeats was determined by PCR and fragment analysis in 282 men (28.6 ± 7.6
8 years) and 61 women (25.5 ± 6.7 years). Individuals were grouped as CAG short (CAG_S) if
9 harboring repeat lengths of ≤21 in men and ≤22 in women, and CAG long (CAG_L) if CAG
10 >21 in men and >22 in women. GGN was considered short (GGN_S) or long (GGN_L) if GGN
11 ≤23 or >23 in men and women. In men, no significant differences in lean body mass or fitness
12 were observed between the CAG_S and CAG_L groups, but a borderline correlation was found
13 for the GGN repeat and lean mass of the extremities (r=-0.11, P=0.06). Women from the
14 CAG_S group had 5.9% greater whole body lean mass (P=0.009), ran 300 m 7.9% faster and
15 jumped up 10.4 % higher than those from the CAG_L group (P=0.05). In women, the CAG
16 repeat number correlated with the maximal isometric force (MVC) normalized per kg of
17 muscle mass of the lower extremities (r=-0.33, P=0.03) and with VO₂max (r=0.27, P=0.04).
18 Men harboring the combination CAG_S and GGN_S jumped 9% higher than those having the
19 combination CAG_L and GGN_L (P<0.05). In summary, the length of CAG and GGN repeat of
20 the AR gene influences the muscle mass, muscle strength and performance in young men and
21 women. The combination CAG_S and GGN_S seem the most advantageous for strength and
22 power development, particularly in women.

1 **Introduction**

2 The muscle mass and strength, as well as aerobic fitness (VO_2max) are related to health and
3 mortality (28). The muscle mass and strength is determined by environmental factors,
4 principally endocrine, nutritional and mechanical loading, and by the genetic background
5 (38). Gene polymorphisms like those encoding of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1)
6 (40), type I collagen (COL1A1) (42), ciliary neurotrophic factor (CNTF) (12), interleukin-6
7 (IL-6) (33), the vitamin D receptor (VDR) (34), insulin-like growth factor-2 (IGF-2) (37),
8 resistin (RETN) (31) and androgen receptor (AR) have been described as influencing either
9 muscle mass or strength.

10 The AR gene is located on the X chromosome (q11.2-q12), and contains eight exons.
11 The exon 1 contains a polyglutamine tract encoded by CAG repeats and a polyglycine tract
12 (GGN) encoded by $(GGT)_3GGG(GGT)_2(GGC)_n$. Polymorphic tracts are close to the region
13 encoding the transactivation-1 domain of the AR protein (27). Both CAG and GGN
14 polymorphisms of the AR gene have been related to incidence of prostatic cancer, breast
15 cancer, plasma hormone levels and other metabolic, cardiovascular and even mental diseases
16 (15, 16, 32, 46).

17 The polyglutamine repeat has an average length of 22 aminoacids (range: 8-35). Short
18 CAG repeats are associated with increased AR transactivation activity, and stronger
19 transcriptional potential (22). The CAG polymorphisms have been associated with the fat free
20 mass phenotype in healthy elders (44). However, it remains to be established if the AR
21 polymorphism influences muscle mass and fitness in young adults.

22 The polyglycine repeat length of AR ranges from 10-30 (18). Short GGN repeat has
23 been shown to be associated with increased AR protein content in cell cultures, that may in
24 turn enhance the response to androgen stimulation (13). It remains unknown if a short GGN
25 repeat number is associated to increased muscle mass or strength in humans.

1 The aim of this study was to determine if androgen receptor polymorphisms are
2 associated to muscle mass and physical fitness in adult men and women. We tested the
3 hypothesis of whether men and women with short CAG and/or short GGN repeats have
4 greater fat free mass and muscle mass, and therefore greater strength and muscle power, than
5 those harboring long CAG and/or long GGN repeats. Since studies in cell culture and animal
6 models have shown that androgen-AR signaling pathway increases the expression of slow-
7 twitch-specific skeletal muscle proteins leading to a more oxidative phenotype (1), we also
8 studied whether AR polymorphisms have an effect on aerobic power ($VO_2\text{max}$) in humans.

9 10 **Methods**

11 *Subjects*

12 Two-hundred eighty-two men and sixty-one women, all Caucasians participated in the study.
13 They were recruited between physically active university students, sports clubs and local
14 police officers in Gran Canaria (Spain). The health status of each participant was established
15 by a medical history and physical examination. Subjects taking any kind of medications or
16 having any chronic disease or hypertension were excluded. The study was performed in
17 accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as regards the conduct of clinical research,
18 being approved by the Ethical Committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria.
19 All volunteers provided their written informed consent before participation in the study.

20 21 *Tests*

22 Tests were carried out over four days. The first testing day started with a 20 ml blood sample
23 which was obtained from an antecubital vein in the supine position, between 7.30 and 8.30
24 a.m. Body composition, jumping performance and maximal isometric force was tested on the

1 second day. The last two days were used to assess sprint performance and anaerobic capacity,
2 as well as maximal aerobic power (VO_2max).

3 4 *Body composition*

5 Whole body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (QDR-
6 1500, Hologic Corp., Software version 7.10, Waltham, MA) as reported in Perez-Gomez et al.
7 (29). Upper and lower limb lean mass (kg) was calculated from the regional analysis of the
8 whole body scan (10, 17), which gives a valid and reliable estimate of muscle mass in the
9 extremities (20).

10 11 *Vertical jump performance and running sprint tests*

12 The forces generated during vertical jumps were measured with a force platform (Kistler,
13 Winterthur, Switzerland), as reported in Ara et al. (2). Two kinds of jumps were performed:
14 Squat jump (SJ), in which countermovement was not permitted, and countermovement jump
15 (CMJ), from standing position subjects were asked to perform a countermovement, intending
16 to reach knee bending angles of around 90° just before impulsion.

17 Subjects performed three maximal indoor 30-m running sprint trials to assess running
18 speed with photocells (General ASDE, Valencia). Each sprint was separated by at least 5
19 minutes rest and the best performance was recorded (43).

20 21 *Anaerobic capacity*

22 An all-out 300-m running test was used to estimate the anaerobic capacity, since the anaerobic
23 metabolic pathways contribute more than 50% to the overall energy expenditure during all-
24 out exercise tests with a duration between 30 and 60 s (6). The test was performed on a 400-m
25 track; the time was recorded manually with a digital stopwatch.

1 *Aerobic maximal power*

2 The maximal oxygen uptake (VO₂max) was estimated using the maximal multistage 20-m
3 shuttle run (23). The time during which the subjects were able to run for was recorded to
4 calculate VO₂max.

5

6 *CAG and GGN repeat polymorphisms*

7 DNA was extracted from blood samples (200 µl) using High Pure PCR Template Preparation
8 Kits (Roche Applied Science). To determine the length of the CAG and GGN repeats the
9 corresponding regions located on the exon 1 of the AR gene (Genbank accession no. M27423)
10 were amplified using two pairs of primers whose sequence has been previously reported (32).
11 One primer from each pair was marked with fluorescent dye (FAM or VIC). Amplification
12 was performed in a 25 µl reaction volume, containing 50 ng of genomic DNA, 200 µM of
13 each deoxynucleotide triphosphate, 1x Fast Start Taq DNA polymerase Buffer (Roche
14 Applied Science, Mannheim, Germany), 1x GC-rich solution buffer (Roche Applied Science)
15 and 1U of Fast Start Taq DNA polymerase (Roche Applied Science). The concentration of
16 each pair of primers was 1.2 and 1.5 µM for the amplification of the CAG and GGN repeats,
17 respectively. PCR conditions were: 30 cycles of 95°C for 45 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for
18 30 sec for CAG amplification; 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 2 min and 72°C for 2 min
19 for GGN amplification. Each PCR was initiated with a denaturation step at 95°C for 5 min
20 and terminated with an extension step at 72°C for 5 min. The PCR product was diluted 1:100
21 in distilled water and 1 µl of the dilution was mixed with 10µl of formamide and 0.3 µl of
22 GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, Warrington, UK), denatured at 98°C
23 for 5 min and cooled on ice. Fragment separation was performed by automated capillary
24 electrophoresis, using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the
25 length was determined with Gene Scan Analysis Software (version 3.7) (Applied

1 Biosystems). After analyzing the sequencing results we observed that the capillary
2 electrophoresis-based ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer gave anomalous results when
3 internal standards supplied by the manufacturer were used. Thus, the actual length of the
4 CAG and GGN repeats was underestimated by 4 and 2 repeat units, respectively. Therefore,
5 the allele size estimation in the capillary electrophoresis system was corrected by using a
6 ladder which was created with the actual size obtained after sequencing.

7 8 *Statistical analysis.*

9 All variables were checked for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. When
10 necessary, the analysis was done on logarithmically transformed data. Since the AR gene is
11 located in the X-chromosome and one of the two alleles is randomly inactivated in women
12 (25), we decided to calculate the mean of two alleles as representative of each pair in women
13 (15, 19). The influence of CAG and GGN repeat lengths on body composition and fitness was
14 determined taking CAG and GGN repeat lengths as either continuous variables or as
15 dichotomous variables with allele cutoff thresholds. The relationship between CAG and GGN
16 as continuous variables with lean body mass and physical fitness variables was examined
17 using linear regression analysis. The median value in both genders (male and female), which
18 resulted in the most balanced grouping was used as cutoff threshold. Thus individuals were
19 grouped as CAG short (CAG_S) if harboring repeat lengths ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and
20 CAG long (CAG_L) if harboring repeat lengths > 21 in men and > 22 in women. Subjects were
21 ascribed to the GGN short (GGN_S) group if harboring repeat lengths of ≤ 23 in men and
22 women, otherwise they were included in the GGN long (GGN_L) group. In addition, the
23 subjects were also grouped if having any of the following haplotype combinations:
24 CAG_S+CGN_L, CAG_L+CGN_S, CAG_L+CGN_L and CAG_S+CGN_S (Table 1).

1 Given the small number of females included in the study, which could underpowered
2 the statistical analysis we decided to study each gender separately using ANOVA with 2
3 factors (CAG and GGN lengths), each with two levels (short and long repeat number). Muscle
4 mass was corrected for differences in height by dividing muscle mass by height² (24).

6 **Results**

7 Subject's body composition, anthropometrics, physical activity and fitness by gender are
8 reported in Table 2. The observed allele frequencies for AR CAG and GGN repeat numbers
9 in the studied subjects are presented in Fig. 1. The assayed women population showed 12
10 CAG alleles, ranging from 15 to 26 repeats, fitting with a normal distribution. The most
11 frequent alleles amongst women were 23>22>24 repeats. The male population showed 17
12 alleles, ranging from 13 to 35 repeats, with a normal distribution. The most frequent alleles in
13 the men's group were 21>23>20 repeats. The GGN repeat showed 6 alleles in women,
14 ranging from 19 to 25 repeats, the most frequent being 23>24 repeats. In men, there were 14
15 alleles, ranging from 12 to 28 repeats. The GGN repeat did not distribute normally either in
16 men or women.

18 *CAG repeat polymorphism*

19 Subject's body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in the GGN_s and
20 GGN_L groups is reported in Table 3. Clear differences were observed between men and
21 women in most variables.

22 The CAG polymorphism was not associated to any studied variable in men. No
23 significant differences were found either in lean body mass or fitness between the CAG_s and
24 CAG_L groups in men (Table 3).

25 In the female group, however, there was an association between the CAG repeat
26 number and the maximal isometric force (MVC) normalized per kg of muscle mass of the

1 lower extremities ($r=-0.33$, $P=0.03$), and between CAG repeat number and $VO_2\max$ ($r=0.27$,
 2 $P=0.04$). The CAG_L females were 2% taller than the CAG_S females ($P<0.05$) (Table 3). The
 3 whole body lean mass was 5.9% greater in women with a CAG_S tract polymorphism
 4 compared to the women with a CAG_L polymorphism (height²-adjusted means: 15.3 ± 1.2 vs
 5 14.4 ± 1.1 kg.m², $P=0.009$). This difference was explained by a 6.1% higher height²-adjusted
 6 muscle mass in the extremities in the group with CAG_S polymorphism ($P<0.05$) with a similar
 7 effect in the arm ($P<0.05$) and legs ($P<0.05$) (Fig. 2). The MVC per kg of muscle of the lower
 8 extremities tended to be higher (+10.6%, $P=0.08$) in the CAG_S females, who also run the
 9 300m test 6.7% ($P<0.05$) faster than CAG_L females (Fig. 3).

11 *GGN repeat polymorphism*

12 Subject's body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in the GGN_S and
 13 GGN_L groups is reported in Table 4. An almost significant inverse association between the
 14 logarithm of the length of the GGN polymorphism and the muscle mass of the extremities
 15 (MME) expressed as kg per height² was observed in men ($MME = 11.6 - 2.3 \times Lg\ GGN$,
 16 $R=0.11$, $P=0.06$). GGN_S men tended to have a higher MVC than GGN_L men ($P=0.11$) (Table
 17 4). In women, there was an inverse relationship between the logarithm of the length of the
 18 GGN polymorphism and the muscle mass of the arms (MMA) expressed either as absolute
 19 value ($MMA = 12.6 - 6.6 \times Lg\ GGN$, $R=0.28$, $P=0.03$) or as kg per height² ($MMAh = 4.9 -$
 20 $2.6 \times Lg\ GGN$, $R=0.30$, $P=0.02$), meaning that the length of the GGN repeat could explain
 21 7.7-8.8%, respectively, of the variability in the muscle mass of the arms in women. The
 22 relationship between the length of the GGN repeat polymorphism and the arm muscle mass
 23 was similar for the dominant and non-dominant arm ($r=-0.25$ and $r=-0.27$, respectively, both
 24 $P<0.05$). Jumping height in both the squat and countermovement jumps was also inversely
 25 related to the length of the GGN repeat polymorphism ($r=-0.28$ and $r=-0.32$, both $P<0.05$),

1 implying that GGN repeat could explain 7.6 and 10.4%, respectively, of the variability in
2 jumping height in females.

3 4 *Interaction between CAG and GGN repeat polymorphism.*

5 The body composition, anthropometrics, physical activity and fitness of men and women
6 grouped as CAG_L+GGN_L, CAG_S+GGN_S, CAG_S+GGN_L, and CAG_L+GGN_S is reported in
7 Tables 5 and 6, respectively. Men having the combination CAG_S and GGN_S jumped 9.0%
8 (P<0.05) higher in the CMJ than those having the combination CAG_L and GGN_L (Fig. 4).
9 Women harboring the combination CAG_L and GGN_L had 11.3 and 10.0% less height²-
10 adjusted muscle mass in the arms than the women having the combinations CAG_S + GGN_S, as
11 well as CAG_S + GGN_L (both P<0.05). Women harboring the combination CAG_S and GGN_S
12 run the 300m 9% faster than the women harboring the CAG_L + GGN_S combination (P<0.05)
13 and the women having the combination CAG_S+GGN_L run 12% faster than the CAG_L+GGN_S
14 women (Fig. 3) (Table 6).

15 16 **Discussion**

17 This study shows that androgen receptor polymorphisms have an influence on muscle mass,
18 strength and physical fitness in healthy adult humans. In general a shorter CAG and/or GGN
19 polymorphism was associated to greater lean mass. This association shows some gender
20 specificity, - which may indicate that differences are more evident in lower androgen
21 environment- and is stronger for the CAG repeat polymorphism than the GGN polymorphism.
22 We have also observed that maximal isometric force in the squatting position, jumping height,
23 running performance in 300m and VO₂max are in part influenced by the type of androgen
24 receptor in humans.

1 *Androgen receptor polymorphisms and lean mass*

2 The women having a CAG repeat number ≤ 22 were smaller, but had greater whole body lean
3 mass, due to greater lean mass in the extremities (i.e., muscle mass), with a similar effect in
4 upper and lower extremities. Muscle mass was enhanced by the same amount in the dominant
5 and non-dominant arms of the women (7, 10) with a short CAG polymorphism. This
6 indicates that the influence of a short CAG polymorphism on muscle mass is independent of
7 muscle use, and suggests that a short CAG repeat number does not appear to favor muscle
8 hypertrophy in response to mechanical loading. In agreement with our interpretation, the
9 muscle hypertrophy elicited by 20 weeks of testosterone enanthate treatment in males was not
10 related to the CAG or GGC repeats in healthy males (45). However, the muscle hypertrophic
11 response to strength training has to be examined in subjects with short and long CAG repeats
12 to definitively rule out an influence of AR repeat polymorphism in the hypertrophic response
13 to mechanical loading.

14 Our results in women can only be compared with those reported by Walsh et al. (44),
15 who studied middle-aged women (mean age of 50 years). In that study, the height adjusted
16 whole body lean mass in the women with a CAG repeat number ≥ 22 was $14.6 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, i.e.
17 rather close to the $14.4 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ that we obtained in the women having a CAG repeat number
18 >22 , despite the differences in age between both population samples. However, while Walsh
19 et al. did not observe significant differences in whole body lean mass and appendicular lean
20 mass attributable to the CAG repeat length, our young women with a CAG repeat number ≤ 22
21 had increased whole body lean mass and muscle mass.

22 In agreement with previous studies we did not observe any association between height
23 and the length of the CAG repeat polymorphism in men (44). However, in our women's
24 group, the CAG_L polymorphism was associated to higher height. Since testosterone
25 administration to prepubertal boys results in lower adult height (47), this could indicate that a

1 long CAG repeat length may influence either longitudinal growth during puberty in females
2 or extend pre-pubertal growth.

3 Although our male subjects having a CAG repeat number >22 had a 1.1% greater
4 height²-adjusted lean body mass than the group with shorter alleles, this difference did not
5 reach statistical significance. This is in contradiction to results from Walsh et al. (44) that
6 reported a 2% greater lean body mass in the subjects with a CAG repeat number ≥ 22 , in a
7 group of 294 men with a mean age of 73 years. The difference between both studies is likely
8 due to the fact that our subjects were much younger (29 years old), had more appendicular
9 muscle mass but lower height²-adjusted whole body lean mass than the subjects studied by
10 Walsh et al., suggesting that with ageing men may increase trunk lean mass, due to changes in
11 other components of the trunk lean mass apart from the muscle tissue as demonstrated by
12 using potassium whole body counting (21). No significant differences in lean body mass,
13 height or fitness were observed in males between the CAG_S and CAG_L groups. Like Walsh et
14 al. (44), we did not observe significant differences in appendicular muscle mass in men
15 related to CAG repeats.

16 In the present investigation we have also examined the influence of the GGN repeat AR
17 polymorphism on muscle mass and physical fitness in healthy humans. In agreement, with our
18 hypothesis there is an inverse relationship between the length of the GGN polymorphism and
19 muscle mass in women, but this effect appears to be confined to both arms. A similar trend
20 was observed in men. It remains to be elucidated why the association was confined to the
21 arms, but this could reflect regional differences in AR expression between the arm and leg
22 muscles, which in turn could be also modulated by differences in mechanical loading between
23 upper and lower extremities (4). However, the relationship between GGN repeat number and
24 muscle mass was similar for the dominant and non-dominant arm, i.e., it does not appear to be
25 depending on mechanical loading, which is higher for the dominant arm.

1 The possibility for an interaction between the CAG and GGN repeat polymorphism has
2 not been previously studied. We have observed that the women having the microsatellite
3 combination CAG_s + GGN_s have about 11% greater muscle mass in the arms than the women
4 having a CAG_L + GGN_L or a CAG_s + GGN_L microsatellite combination. The CAG_s + GGN_s
5 microsatellite combination has been associated to stronger androgen signaling (16, 27), and
6 our results support the hypothesis that this combination influence muscular mass in women.
7 However, a similar association was not observed in men. It is possible that the advantage
8 conferred by the microsatellite CAG_s + GGN_s combination on muscular mass and physical
9 performance is only present in a low-androgen environment, as it occurs in women.

11 *Androgen receptor polymorphism and fitness*

12 In agreement with our hypothesis, we found an inverse correlation between CAG repeat
13 length and maximal isometric force in the squatting position (normalized by the muscle mass
14 of the lower extremities), although this effect was statistically significant only in women.
15 Thus, for a given muscle mass, the length of the CAG repeat polymorphism could explain
16 11% of the variability in maximal isometric force. This is a considerable amount since studies
17 using dizygotic and monozygotic twins have estimated that 30-60% of the variability in whole
18 body fat free mass and strength is due to genetic factors (38).

19 The muscle mass of the lower extremities is the main determinant of maximal
20 isometric force (14) and peak power (30), to the extend that gender differences in maximal
21 isometric force (present study) or peak power output (30) are cancelled when force or power
22 are divided by the lean mass of the lower extremities, (Table 2). The women with a small
23 CAG repeat number had higher running performance in 300 m running test. This effect was
24 not accentuated when a CAG_s haplotype was combined with a GGN_s haplotype, despite the

1 fact that the latter was associated to higher jumping height in women and in men when
2 combined with a CAG_s haplotype.

3 Jumping performance is determined by body composition (3) and factors that
4 determine the speed of muscle activation and rate of force development, among which is
5 critical the percentage of type II fibers (5). Performance in the 300m running test depends in
6 great part on the muscle mass (30) but also on other factors which determine the contractile
7 and metabolic properties of the muscles, such as a high percentage of fast-twitch (or type II)
8 fibers and a high anaerobic capacity (6, 11). The enhanced performance achieved in these
9 tasks could also be explained by a higher “muscle quality” (MQ, strength/muscle volume of
10 the trained muscle group), since for a given muscle mass, CAG_s was associated with greater
11 maximal isometric force (41). Altogether, our results indicate that a CAG_s haplotype may
12 confer a functional advantage for tasks requiring muscle power or very high metabolic rate as
13 observed during prolonged sprinting.

14 It remains to be elucidated if CAG_s and/or GGN_s haplotypes are associated to an
15 increased proportion of type II fibers and/or enhanced anaerobic capacity. Animal studies
16 indicate that increased androgen signaling may stimulate the expression of slow-twitch-
17 specific skeletal muscle proteins while inhibiting fast-twitch-specific skeletal muscle proteins
18 (1). However, there are no gender differences in muscle fiber types in humans (36) and 20
19 weeks treatment with testosterone enanthate did not change muscle fibers in human males
20 (39).

21 Finally we should highlight that we have observed an association between a CAG repeat
22 number and VO₂max, which is a marker of aerobic fitness. Epidemiological studies have
23 reported that a higher VO₂max is associated to lower morbidity and mortality (28). Thus, a
24 CAG_L could also be associated with lower overall mortality in women, a possibility that may
25 be worthy analyzing.

1 VO₂max depends on maximal oxygen delivery and muscle oxidative capacity (35) and
2 the former is mainly determined by the maximal pumping capacity of the heart (8) and blood
3 hemoglobin concentration (9). Since a CAG_L genotype is thought to be associated with
4 reduced androgenic effects, it is hard to figure out how a reduced androgenic signaling could
5 contribute to enhance VO₂max. A possibility is that androgen-AR signaling may play a role in
6 cardiac remodeling in response to exercise (26). More studies will be needed to confirm this
7 association and explain by which mechanism CAG_L haplotypes may confer advantage for
8 endurance exercise.

9 In summary, androgen receptor polymorphisms have an influence on whole body lean
10 mass, muscle mass and fitness in healthy adult young women. This association is stronger for
11 the CAG repeat polymorphism than the GGN polymorphism. A CAG repeat number ≤ 22 is
12 associated to greater muscle mass and muscle force, even when normalized by height,
13 implying a greater muscle quality. Consequently, jumping height and sprint running
14 performances were also higher in the women harboring short CAG repeat numbers. On the
15 other hand, the CAG repeat number was positively associated to greater aerobic fitness in
16 females. Given the relevance of aerobic fitness for health, this association deserves further
17 studies to verify if a long CAG repeat number is also associated with lower morbidity and
18 mortality at the population level.

19

20

1 **References**

- 2
- 3 1. **Altuwaijri S, Lee DK, Chuang KH, Ting HJ, Yang Z, Xu Q, Tsai MY, Yeh S, Hanchett**
 4 **LA, Chang HC, and Chang C.** Androgen receptor regulates expression of skeletal muscle-
 5 specific proteins and muscle cell types. *Endocrine* 25: 27-32, 2004.
- 6 2. **Ara I, Vicente-Rodriguez G, Jimenez-Ramirez J, Dorado C, Serrano-Sanchez JA, and**
 7 **Calbet JA.** Regular participation in sports is associated with enhanced physical fitness and
 8 lower fat mass in prepubertal boys. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004.
- 9 3. **Ara I, Vicente-Rodriguez G, Perez-Gomez J, Jimenez-Ramirez J, Serrano-Sanchez JA,**
 10 **Dorado C, and Calbet JA.** Influence of extracurricular sport activities on body composition
 11 and physical fitness in boys: a 3-year longitudinal study. *Int J Obes (Lond)* 30: 1062-1071,
 12 2006.
- 13 4. **Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower BA, Hunter GR, Goodman A, McLafferty CL,**
 14 **Jr., and Urban RJ.** Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA
 15 concentrations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E383-390, 2001.
- 16 5. **Bosco C, Komi PV, Tihanyi J, Fekete G, and Apor P.** Mechanical power and fiber
 17 composition of human leg extensor muscles. *Eur J Appl Physiol* 51: 129-135, 1983.
- 18 6. **Calbet JA, De Paz JA, Garatachea N, Cabeza De Vaca S, and Chavarren J.** Anaerobic
 19 energy provision does not limit Wingate exercise performance in endurance-trained cyclists. *J*
 20 *Appl Physiol* 94: 668-676, 2003.
- 21 7. **Calbet JA, Dorado C, Diaz-Herrera P, and Rodriguez-Rodriguez LP.** High femoral bone
 22 mineral content and density in male football (soccer) players. *Med Sci Sports Exerc* 33: 1682-
 23 1687, 2001.
- 24 8. **Calbet JA, Jensen-Urstad M, Van Hall G, Holmberg HC, Rosdahl H, and Saltin B.**
 25 Maximal muscular vascular conductances during whole body upright exercise in humans. *J*
 26 *Physiol* 558: 319-331, 2004.
- 27 9. **Calbet JA, Lundby C, Koskolou M, and Boushel R.** Importance of hemoglobin
 28 concentration to exercise: Acute manipulations. *Respir Physiol Neurobiol* 151: 132-140,
 29 2006.
- 30 10. **Calbet JA, Moysi JS, Dorado C, and Rodriguez LP.** Bone mineral content and density in
 31 professional tennis players. *Calcif Tissue Int* 62: 491-496, 1998.
- 32 11. **Cristea A, Korhonen MT, Hakkinen K, Mero A, Alen M, Sipila S, Viitasalo JT,**
 33 **Koljonen MJ, Suominen H, and Larsson L.** Effects of combined strength and sprint
 34 training on regulation of muscle contraction at the whole-muscle and single fibre levels in
 35 elite master sprinters. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2008.
- 36 12. **De Mars G, Windelinckx A, Beunen G, Delecluse C, Lefevre J, and Thomis MA.**
 37 Polymorphisms in the CNTF and CNTF receptor genes are associated with muscle strength in
 38 men and women. *J Appl Physiol* 102: 1824-1831, 2007.

- 1 13. **Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, and Barrack ER.** Effect of GGC (glycine) repeat
2 length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *The Prostate* 62:
3 133-139, 2005.
- 4 14. **Frontera WR, Hughes VA, Lutz KJ, and Evans WJ.** A cross-sectional study of muscle
5 strength and mass in 45- to 78-yr-old men and women. *J Appl Physiol* 71: 644-650, 1991.
- 6 15. **Gonzalez A, Javier Dorta F, Rodriguez G, Brito B, Rodriguez MA, Cabrera A, Diaz-
7 Chico JC, Reyes R, Aguirre-Jaime A, and Nicolas Diaz-Chico B.** Increased risk of breast
8 cancer in women bearing a combination of large CAG and GGN repeats in the exon 1 of the
9 androgen receptor gene. *Eur J Cancer* 43: 2373-2380, 2007.
- 10 16. **Gonzalez Hernandez A, Cabrera de Leon A, Dominguez Coello S, Almeida Gonzalez D,
11 Rodriguez Perez MC, Brito Diaz B, Aguirre-Jaime A, and Diaz-Chico BN.** Serum
12 Resistin and Polymorphisms of Androgen Receptor CAG(n) and GGN(n) and Aromatase
13 TTTA(n). *Obesity (Silver Spring)* 16: 2107-2112, 2008.
- 14 17. **Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A,
15 Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, and Calbet JA.** Gender dimorphism in skeletal muscle
16 leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. *PLoS ONE* 3: e3466, 2008.
- 17 18. **Hakimi JM, Schoenberg MP, Rondinelli RH, Piantadosi S, and Barrack ER.** Androgen
18 receptor variants with short glutamine or glycine repeats may identify unique subpopulations
19 of men with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 3: 1599-1608, 1997.
- 20 19. **Jaaskelainen J, Korhonen S, Kuulasmaa T, Kurl S, Niskanen L, Vanhala M,
21 Hippelainen M, Voutilainen R, and Heinonen S.** Androgen receptor gene CAG repeat
22 length in women with metabolic syndrome. *Gynecol Endocrinol* 24: 411-416, 2008.
- 23 20. **Kim J, Wang Z, Heymsfield SB, Baumgartner RN, and Gallagher D.** Total-body skeletal
24 muscle mass: estimation by a new dual-energy X-ray absorptiometry method. *Am J Clin Nutr*
25 76: 378-383, 2002.
- 26 21. **Kyle UG, Genton L, Hans D, Karsegard VL, Michel JP, Slosman DO, and Pichard C.**
27 Total body mass, fat mass, fat-free mass, and skeletal muscle in older people: cross-sectional
28 differences in 60-year-old persons. *J Am Geriatr Soc* 49: 1633-1640, 2001.
- 29 22. **Lee DK, and Chang C.** Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of
30 androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4043-
31 4054, 2003.
- 32 23. **Leger LA, Mercier D, Gadoury C, and Lambert J.** The multistage 20 metre shuttle run test
33 for aerobic fitness. *J Sports Sci* 6: 93-101, 1988.
- 34 24. **Lietzke MH.** Relation between weightlifting totals and body weight. *Science* 124: 486-487,
35 1956.
- 36 25. **Lyon MF.** X-chromosome inactivation. *Curr Biol* 9: R235-237, 1999.
- 37 26. **Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, and Schiebinger RJ.**
38 Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98: 256-261, 1998.

- 1 27. **Navarro D, Luzardo OP, Fernandez L, Chesa N, and Diaz-Chico BN.** Transition to
2 androgen-independence in prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular*
3 *biology* 81: 191-201, 2002.
- 4 28. **Pedersen BK.** Body mass index-independent effect of fitness and physical activity for all-
5 cause mortality. *Scand J Med Sci Sports* 17: 196-204, 2007.
- 6 29. **Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Royo IA, Vicente-Rodriguez G, Ortiz**
7 **RA, Chavarren J, and Calbet JA.** Effects of weight lifting training combined with
8 plyometric exercises on physical fitness, body composition, and knee extension velocity
9 during kicking in football. *Appl Physiol Nutr Metab* 33: 501-510, 2008.
- 10 30. **Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez**
11 **JJ, Dorado C, and Calbet JA.** Role of muscle mass on sprint performance: gender
12 differences? *Eur J Appl Physiol* 102: 685-694, 2008.
- 13 31. **Pistilli EE, Gordish-Dressman H, Seip RL, Devaney JM, Thompson PD, Price TB,**
14 **Angelopoulos TJ, Clarkson PM, Moyna NM, Pescatello LS, Visich PS, Zoeller RF,**
15 **Hoffman EP, and Gordon PM.** Resistin polymorphisms are associated with muscle, bone,
16 and fat phenotypes in white men and women. *Obesity (Silver Spring)* 15: 392-402, 2007.
- 17 32. **Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R, Falcon O, Jr., Diaz**
18 **BP, Rivero JF, Perucho M, Diaz-Chico BN, and Diaz-Chico JC.** Alleles with short CAG
19 and GGN repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial
20 cancer. *International journal of cancer* 118: 1420-1425, 2006.
- 21 33. **Roth SM, Schragger MA, Lee MR, Metter EJ, Hurley BF, and Ferrell RE.** Interleukin-6
22 (IL6) genotype is associated with fat-free mass in men but not women. *J Gerontol A Biol Sci*
23 *Med Sci* 58: B1085-1088, 2003.
- 24 34. **Roth SM, Zmuda JM, Cauley JA, Shea PR, and Ferrell RE.** Vitamin D receptor genotype
25 is associated with fat-free mass and sarcopenia in elderly men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*
26 59: 10-15, 2004.
- 27 35. **Saltin B, and Calbet JA.** Point: in health and in a normoxic environment, VO₂ max is
28 limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow. *J Appl Physiol* 100:
29 744-745, 2006.
- 30 36. **Schantz P, Randall-Fox E, Hutchison W, Tyden A, and Astrand PO.** Muscle fibre type
31 distribution, muscle cross-sectional area and maximal voluntary strength in humans. *Acta*
32 *Physiol Scand* 117: 219-226., 1983.
- 33 37. **Schragger MA, Roth SM, Ferrell RE, Metter EJ, Russek-Cohen E, Lynch NA, Lindle RS,**
34 **and Hurley BF.** Insulin-like growth factor-2 genotype, fat-free mass, and muscle
35 performance across the adult life span. *J Appl Physiol* 97: 2176-2183, 2004.
- 36 38. **Silventoinen K, Magnusson PK, Tynelius P, Kaprio J, and Rasmussen F.** Heritability of
37 body size and muscle strength in young adulthood: a study of one million Swedish men.
38 *Genetic epidemiology* 2008.
- 39 39. **Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer**
40 **TW, Casaburi R, Shen R, and Bhasin S.** Testosterone-induced increase in muscle size in

- 1 healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol*
2 *Metab* 283: E154-164, 2002.
- 3 40. **Sun G, Gagnon J, Chagnon YC, Perusse L, Despres JP, Leon AS, Wilmore JH, Skinner**
4 **JS, Borecki I, Rao DC, and Bouchard C.** Association and linkage between an insulin-like
5 growth factor-1 gene polymorphism and fat free mass in the HERITAGE Family Study. *Int J*
6 *Obes Relat Metab Disord* 23: 929-935, 1999.
- 7 41. **Tracy BL, Ivey FM, Hurlbut D, Martel GF, Lemmer JT, Siegel EL, Metter EJ, Fozard**
8 **JL, Fleg JL, and Hurley BF.** Muscle quality. II. Effects Of strength training in 65- to 75-yr-
9 old men and women. *J Appl Physiol* 86: 195-201, 1999.
- 10 42. **Van Pottelbergh I, Goemaere S, Nuytinck L, De Paepe A, and Kaufman JM.** Association
11 of the type I collagen alpha1 Sp1 polymorphism, bone density and upper limb muscle strength
12 in community-dwelling elderly men. *Osteoporos Int* 12: 895-901, 2001.
- 13 43. **Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Serrano-Sanchez JA, Dorado C, and**
14 **Calbet JA.** High femoral bone mineral density accretion in prepubertal soccer players. *Med*
15 *Sci Sports Exerc* 36: 1789-1795, 2004.
- 16 44. **Walsh S, Zmuda JM, Cauley JA, Shea PR, Metter EJ, Hurley BF, Ferrell RE, and Roth**
17 **SM.** Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J*
18 *Appl Physiol* 98: 132-137, 2005.
- 19 45. **Woodhouse LJ, Reisz-Porszasz S, Javanbakht M, Storer TW, Lee M, Zerounian H, and**
20 **Bhasin S.** Development of models to predict anabolic response to testosterone administration
21 in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E1009-1017, 2003.
- 22 46. **Yong EL, Lim J, Qi W, Ong V, and Mifsud A.** Molecular basis of androgen receptor
23 diseases. *Annals of medicine* 32: 15-22, 2000.
- 24 47. **Zachmann M, Ferrandez A, Murset G, Gnehm HE, and Prader A.** Testosterone treatment
25 of excessively tall boys. *J Pediatr* 88: 116-123, 1976.

26

27

1 **Acknowledgments**

2 The study was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56076-C06-
3 04/ACTI) and FEDER, Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de
4 Canarias (2006/179 0001 and FEDER), Proyecto Interreg IIIB BIOPOLIS, Fundación del
5 Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC), Cabildo de Gran Canaria, Cabildo de
6 Tenerife and La Caja de Canarias. The authors thank José Navarro de Tuero for his excellent
7 technical assistance.

Table 1. CAG and GGN repeat polymorphisms in the study population.

	CAG _s	CAG _L	GGN _s	GGN _L	CAG _s +CGN _L	CAG _L +CGN _s	CAG _L +CGN _L	CAG _s +CGN _s
Men	151	131	170	112	64	83	48	87
Women	39	22	31	30	20	12	10	19
Total	190	153	201	142	84	95	58	106

Individuals were grouped as CAG short (CAG_s) if harboring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if harboring repeat lengths of > 21 in men and > 22 in women. Subjects were ascribed to the GGN short (GGN_s) group if harboring repeat lengths of ≤ 23 in men and women, otherwise they were included in the GGN long (GGN_L) group.

Table 2. Subject's body composition, anthropometrics, physical activity and fitness.

	Men		Women	
	mean \pm sd	n	mean \pm sd	n
Age (years)	28.8 \pm 7.6 *	282	25.5 \pm 6.7	61
Height (cm)	176.8 \pm 5.5 *	282	165.4 \pm 5.9	61
Body mass (kg)	79.2 \pm 10.3 *	282	61.6 \pm 8.1	61
Percentage of body fat	19.3 \pm 7.3 *	282	28.2 \pm 6.8	61
Lean body mass (kg)	59.5 \pm 5.6 *	282	40.9 \pm 3.4	61
Lean body mass/Ht ² (kg.m ⁻²)	19.0 \pm 1.5 *	282	15.0 \pm 1.2	61
Muscle mass arms (kg)	6.7 \pm 0.9 *	282	3.6 \pm 0.5	61
Muscle mass legs (kg)	19.8 \pm 2.2 *	282	12.9 \pm 1.4	61
Muscle mass extremities (kg)	26.4 \pm 2.9 *	282	16.5 \pm 1.7	61
Muscle mass arms/ Ht ² (kg.m ⁻²)	2.1 \pm 0.3 *	282	1.3 \pm 0.2	61
Muscle mass legs/Ht ² (kg.m ⁻²)	6.3 \pm 0.6 *	282	4.7 \pm 0.5	61
Muscle mass extremities/ Ht ² (kg.m ⁻²)	8.4 \pm 0.8 *	282	6.0 \pm 0.6	61
Sports history (years)	8.0 \pm 6.0	282	5.6 \pm 6.7	61
Jumping tests				
SJJH (m)	0.292 \pm 0.054 *	251	0.227 \pm 0.040	56
SJWmax (w)	3409 \pm 536 *	192	2243 \pm 310	44
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	173 \pm 19	192	174 \pm 18	44
CMJJH (m)	0.331 \pm 0.061 *	252	0.265 \pm 0.043	56
CMJWmax (w)	3586 \pm 556 *	194	2454 \pm 336	44
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	180 \pm 28	192	191 \pm 18	44
Strength				
MVC (kgf)	106 \pm 21 *	237	73 \pm 14	44
MVC/MML (kgf.kg ⁻¹)	5.4 \pm 1.0	237	5.7 \pm 1.1	42
Running test				
T _{30m} (s)	4.53 \pm 0.29 *	272	5.10 \pm 0.28	54
T _{300m} (s)	50.17 \pm 8.65 *	271	59.48 \pm 6.89	54
Aerobic power				
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .ml ⁻¹)	47.3 \pm 7.5 *	267	41.3 \pm 7.1	54

Ht: height; SJJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power in squat jumps; SJWmax/MML: maximal power in squat jumps per kg of muscle mass in the lower extremities (MML); CMJJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax: maximal power in countermovement jumps; CMJWmax/MML: maximal power in countermovement jumps per kg of muscle mass in the lower extremities; MVC: maximal isometric force in the squatting position; T_{30m} and T_{300m} running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively. * P<0.05 men vs. women

Table 3. Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in men and women with CAG_s and CAG_L androgen receptor polymorphisms.

	Men				Women							
	CAG _s		n	CAG _L		n	CAG _L		n			
Age	28.3	± 7.6	151	29.5	± 7.6	131	24.4	± 5.6	38	27.2	± 8.1	22.0
Height (cm)	176.5	± 5.3	151	177.1	± 5.8	131	164.2	± 5.5 *	39	167.5	± 5.9	22.0
Body mass (kg)	77.5	± 9.7	151	78.8	± 10.9	131	59.9	± 7.5	39	62.0	± 8.4	22.0
Percentage of body fat (%)	19.3	± 6.7	151	19.3	± 8.0	131	27.0	± 5.8	39	30.3	± 8.1	22.0
Lean body mass (kg)	59.1	± 5.8	151	60.0	± 5.4	131	41.2	± 3.7	39	40.4	± 2.8	22.0
Lean mass arms (kg)	6.6	± 1.0	151	6.8	± 0.9	131	3.6	± 0.5	39	3.5	± 0.4	22.0
Lean mass legs (kg)	19.7	± 2.3	151	19.8	± 2.0	131	13.0	± 1.5	39	12.8	± 1.0	22.0
Lean mass extremities (kg)	26.3	± 3.1	151	26.6	± 2.7	131	16.6	± 1.9	39	16.3	± 1.3	22.0
Lean mass arms/Ht ² (kg.m ⁻²)	2.1	± 0.3	151	2.2	± 0.3	131	1.3	± 0.2 *	39	1.2	± 0.2	22.0
Lean mass legs/Ht ² (kg.m ⁻²)	6.3	± 0.6	151	6.3	± 0.6	131	4.8	± 0.5 *	39	4.6	± 0.4	22.0
Lean mass extremities/Ht ² (kg.m ⁻²)	8.4	± 0.9	151	8.5	± 0.8	131	6.2	± 0.7 *	39	5.8	± 0.5	22.0
Sports history (years)	7.9	± 6.3	145	8.1	± 5.3	128	8.9	± 9.6	37	4.8	± 5.6	22.0
Jumping tests												
SJJH (m)	0.30	± 0.05	133	0.29	± 0.05	118	0.23	± 0.03	35	0.23	± 0.05	21.00
SJWmax (w)	3387	± 544	94	3429	± 530	98	2262	± 338	26	2215	± 271	18
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	173.5	± 18.7	94	172.1	± 19.2	98	174.8	± 19.1	26	173.9	± 16.1	18.0
CMJJH (m)	0.34	± 0.06	134	0.32	± 0.06	118	0.27	± 0.04	35	0.26	± 0.05	21.00
CMJWmax (w)	3571	± 595	96	3601	± 519	98	2484	± 342	26	2409	± 330	18
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	180.9	± 31.1	94	178.6	± 25.1	98	192.0	± 17.3	26	188.9	± 18.3	18.0
Strength												
MVC (kg)	105.8	± 22.0	126	107.0	± 20.4	111	75.6	± 12.9	27	67.8	± 15.7	17.0
MVC/MML (kg.kg ⁻¹)	5.4	± 1.0	126	5.4	± 1.0	111	5.9	± 0.9	25	5.3	± 1.2	17.0
Running tests												
T30m (s)	4.51	± 0.25	147	4.56	± 0.33	125	5.05	± 0.23	35	5.18	± 0.35	19.00
T300m (s)	49.7	± 7.1	148	50.7	± 10.2	123	57.8	± 4.9 *	38	62.4	± 8.7	22.0
Maximal aerobic power												
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	47.0	± 7.9	142	47.7	± 7.1	124	40.8	± 6.6	35	42.6	± 8.1	20.0

Ht: height; SJJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power in squat jumps; SJWmax/MML: maximal power in squat jumps per kg of muscle mass in the lower extremities (MML); CMJJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax: maximal power in countermovement jumps; CMJWmax/MML: maximal power in countermovement jumps per kg of muscle mass in the lower extremities; MVC: maximal isometric force in the squatting position; T_{30m} and T_{300m} running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively. * P<0.05 compared with CAG_L (same gender).

Table 4. Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in men and women with GGN_s and GGN_L androgen receptor polymorphisms.

	Men				Women							
	GGN _s		n	GGN _L		n	GGN _L		n			
Age	28.7	± 7.1	170	29.1	± 8.4	112	26.4	± 7.5	31	24.5	± 5.8	30
Height (cm)	176.6	± 5.5	170	177.1	± 5.6	112	165.9	± 6.2	31	164.8	± 5.5	30
Body mass (kg)	77.5	± 9.8	170	79.1	± 10.9	112	60.6	± 9.1	31	60.8	± 6.5	30
Percentage of body fat (%)	19.0	± 6.9	170	19.7	± 7.9	112	27.6	± 8.4	31	28.8	± 4.9	30
Lean body mass (kg)	59.4	± 5.9	170	59.8	± 5.2	112	41.0	± 3.7	31	40.8	± 3.1	30
Lean mass arms (kg)	6.6	± 1.0	170	6.7	± 0.9	112	3.6	± 0.5	31	3.5	± 0.4	30
Lean mass legs (kg)	19.7	± 2.3	170	19.9	± 2.1	112	12.9	± 1.5	31	13.0	± 1.2	30
Lean mass extremities (kg)	26.3	± 3.0	170	26.6	± 2.8	112	16.5	± 1.9	31	16.5	± 1.6	30
Lean mass arms/Ht ² (kg.m ⁻²)	2.1	± 0.3	170	2.1	± 0.3	112	1.3	± 0.2	31	1.3	± 0.1	30
Lean mass legs/Ht ² (kg.m ⁻²)	6.3	± 0.6	170	6.3	± 0.6	112	4.7	± 0.5	31	4.8	± 0.5	30
Lean mass extremities/Ht ² (kg.m ⁻²)	8.4	± 0.8	170	8.5	± 0.8	112	6.0	± 0.7	31	6.1	± 0.6	30
Sports history (years)	7.8	± 5.9	165	8.3	± 5.8	108	7.1	± 8.7	29	7.6	± 8.4	30
Jumping tests												
SJJH (m)	0.29	± 0.05	150	0.29	± 0.06	101	0.23	± 0.04	29	0.22	± 0.04	27
SJWmax (w)	3394	± 519	118	3432	± 566	74	2238	± 313	22	2248	± 315	22
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	172.1	± 18.8	118	174.0	± 19.2	74	176.2	± 18.8	22	172.7	± 16.9	22
CMJJH (m)	0.34	± 0.06	151	0.32	± 0.06	101	0.27	± 0.05	29	0.26	± 0.04	27
CMJWmax (w)	3594	± 549	120	3574	± 571	74	2445	± 340	22	2462	± 339	22
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	180.1	± 26.9	118	179.0	± 30.2	74	192.4	± 18.2	22	189.0	± 17.2	22
Strength												
MVC (kg)	107.6	± 22.0	141	104.6	± 20.1	96	73.0	± 11.0	23	72.1	± 17.6	21
MVC/MML (kg.kg ⁻¹)	5.5	± 1.0	141	5.3	± 1.0	96	5.8	± 1.0	22	5.6	± 1.1	20
Running tests												
T30m (s)	4.53	± 0.27	162	4.54	± 0.32	110	5.12	± 0.32	28	5.07	± 0.22	26
T300m (s)	49.7	± 7.3	161	50.9	± 10.3	110	60.7	± 7.9	31	58.2	± 5.4	29
Maximal aerobic power												
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	47.6	± 7.3	161	46.9	± 7.8	105	41.4	± 8.5	28	41.6	± 5.7	27

Ht: height; SJJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power in squat jumps; SJWmax/MML: maximal power in squat jumps per kg of muscle mass in the lower extremities (MML); CMJJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax: maximal power in countermovement jumps; CMJWmax/MML: maximal power in countermovement jumps per kg of muscle mass in the lower extremities; MVC: maximal isometric force in the squatting position; T_{30m} and T_{300m} running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively. * P<0.05 compared with GGN_L (same gender).

Table 5. Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in men harboring the microsatellite combinations CAG_L+GGN_L, CAG_S+GGN_S, CAG_S+GGN_L, and CAG_L+GGN_S.

	CAG _L +GGN _L		CAG _S +GGN _S		CAG _S +GGN _L		CAG _L +GGN _S	
		n		n		n		n
Age	29.9 ± 8.1	48	28.1 ± 6.9	87	28.5 ± 8.5	64	29.2 ± 7.3	83
Height (cm)	176.8 ± 6.0	48	176.0 ± 5.2	87	177.3 ± 5.4	64	177.3 ± 5.8	83
Body mass (kg)	80.0 ± 12.8	48	76.9 ± 9.9	87	78.3 ± 9.4	64	78.2 ± 9.7	83
Percentage of body fat (%)	20.6 ± 8.6	48	19.5 ± 6.2	87	19.1 ± 7.3	64	18.5 ± 7.6	83
Lean body mass (kg)	59.6 ± 5.3	48	58.5 ± 6.2	87	59.9 ± 5.2	64	60.3 ± 5.5	83
Lean mass arms (kg)	6.7 ± 0.8	48	6.5 ± 1.0	87	6.7 ± 0.9	64	6.8 ± 0.9	83
Lean mass legs (kg)	19.6 ± 2.0	48	19.5 ± 2.4	87	20.1 ± 2.2	64	19.9 ± 2.1	83
Lean mass extremities (kg)	26.3 ± 2.7	48	25.9 ± 3.3	87	26.8 ± 2.9	64	26.7 ± 2.7	83
Lean mass arms/Ht ² (kg.m ⁻²)	2.1 ± 0.3	48	2.1 ± 0.3	87	2.1 ± 0.3	64	2.2 ± 0.3	83
Lean mass legs/Ht ² (kg.m ⁻²)	6.3 ± 0.6	48	6.3 ± 0.7	87	6.4 ± 0.6	64	6.3 ± 0.6	83
Lean mass extremities/Ht ² (kg.m ⁻²)	8.4 ± 0.8	48	8.4 ± 0.9	87	8.5 ± 0.8	64	8.5 ± 0.8	83
Sports history	9.2 ± 5.5	47	8.1 ± 6.6	84	7.6 ± 6.0	61	7.5 ± 5.2	81
Jumping tests								
SJJH (m)	0.28 ± 0.05	44	0.30 ± 0.05	76	0.30 ± 0.06	57	0.29 ± 0.05	74
SJWmax (w)	3438 ± 577	39	3365 ± 537	59	3425 ± 561	35	3423 ± 502	59
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	175.4 ± 20.3	39	174.1 ± 19.2	59	172.6 ± 18.1	35	170.0 ± 18.3	59
CMJJH (m)	0.31 ± 0.06 *	44	0.34 ± 0.07	77	0.33 ± 0.06	57	0.33 ± 0.05	74
CMJWmax (w)	3560 ± 577	39	3560 ± 611	61	3591 ± 573	35	3628 ± 479	59
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	181.6 ± 19.5	39	183.7 ± 25.3	59	176.1 ± 38.9	35	176.5 ± 28.2	59
Strength								
MVC (kg)	103.9 ± 20.9	44	106.3 ± 23.7	74	105.3 ± 19.5	52	109.1 ± 20.0	67
MVC/MML (kg.kg ⁻¹)	5.3 ± 1.1	44	5.5 ± 1.1	74	5.2 ± 0.9	52	5.5 ± 0.9	67
Running tests								
T30m (s)	4.56 ± 0.37	47	4.50 ± 0.23	84	4.52 ± 0.28	63	4.56 ± 0.31	78
T300m (s)	51.9 ± 12.5	47	49.4 ± 6.1	85	50.2 ± 8.3	63	50.0 ± 8.5	76
Maximal aerobic power								
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	46.7 ± 8.3	44	46.9 ± 8.2	81	47.1 ± 7.6	61	48.3 ± 6.3	80

Ht: height; SJJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power in squat jumps; SJWmax/MML: maximal power in squat jumps per kg of muscle mass in the lower extremities (MML); CMJJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax: maximal power in countermovement jumps; CMJWmax/MML: maximal power in countermovement jumps per kg of muscle mass in the lower extremities; MVC: maximal isometric force in the squatting position; T_{30m} and T_{300m} running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively. * P<0.05 compared to CAG_S+GGN_S

Table 6. Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in women harboring the microsatellite combinations CAG_L+GGN_L, CAG_S+GGN_S, CAG_S+GGN_L, and CAG_L+GGN_S.

	CAG _L +GGN _L	n	CAG _S +GGN _S	n	CAG _S +GGN _L	n	CAG _L +GGN _S	n
Age	25.4 ± 5.6	10	24.8 ± 5.4	18	24.1 ± 5.9	20	28.8 ± 9.7	12
Height (cm)	167.3 ± 4.4	10	164.8 ± 5.5	19	163.6 ± 5.6	20	167.6 ± 7.1	12
Body mass (kg)	61.5 ± 5.3	10	59.4 ± 8.1	19	60.4 ± 7.1	20	62.5 ± 10.5	12
Percentage of body fat (%)	30.4 ± 5.3	10	26.0 ± 6.8	19	28.0 ± 4.6	20	30.1 ± 10.1	12
Lean body mass (kg)	40.3 ± 2.1	10	41.3 ± 4.0	19	41.0 ± 3.5	20	40.5 ± 3.3	12
Lean mass arms (kg)	3.3 ± 0.4	10	3.7 ± 0.5	19	3.5 ± 0.4	20	3.6 ± 0.4	12
Lean mass legs (kg)	12.8 ± 0.7	10	12.9 ± 1.7	19	13.1 ± 1.4	20	12.8 ± 1.3	12
Lean mass extremities (kg)	16.1 ± 1.0	10	16.6 ± 2.1	19	16.7 ± 1.8	20	16.4 ± 1.5	12
Lean mass arms/Ht ² (kg.m ⁻²)	1.2 ± 0.2 *	10	1.3 ± 0.2	19	1.3 ± 0.1 \$	20	1.3 ± 0.2	12
Lean mass legs/Ht ² (kg.m ⁻²)	4.6 ± 0.4	10	4.8 ± 0.6	19	4.9 ± 0.5	20	4.6 ± 0.4	12
Lean mass extremities/Ht ² (kg.m ⁻²)	5.8 ± 0.5	10	6.1 ± 0.7	19	6.2 ± 0.6	20	5.9 ± 0.6	12
Sports history	6.0 ± 7.0	10	9.4 ± 10.4	17	8.5 ± 9.1	20	3.8 ± 4.2	12
Jumping tests								
SJJH (m)	0.23 ± 0.04	10	0.24 ± 0.03	18	0.22 ± 0.03	17	0.23 ± 0.05	11
SJWmax (w)	2219 ± 294	9	2256 ± 352	13	2268 ± 339	13	2212 ± 265	9
SJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	174.6 ± 16.8	9	178.4 ± 20.7	13	171.3 ± 17.5	13	173.2 ± 16.4	9
CMJJH (m)	0.26 ± 0.05	10	0.27 ± 0.04	18	0.26 ± 0.04	17	0.27 ± 0.06	11
CMJWmax (w)	2336 ± 313	9	2420 ± 346	13	2549 ± 340	13	2482 ± 349	9
CMJWmax/MML (w.kg ⁻¹)	184.0 ± 18.3	9	191.4 ± 19.1	13	192.5 ± 16.1	13	193.9 ± 17.8	9
Strength								
MVC (kg)	66.0 ± 17.7	8	75.4 ± 7.6	14	75.9 ± 17.2	13	69.4 ± 14.6	9
MVC/MML (kg.kg ⁻¹)	5.2 ± 1.2	8	6.0 ± 0.7	13	5.9 ± 1.1	12	5.5 ± 1.3	9
Running tests								
T30m (s)	5.20 ± 0.29	9	5.11 ± 0.28	18	5.00 ± 0.15	17	5.16 ± 0.41	10
T300m (s)	60.6 ± 7.0	10	58.7 ± 5.6	19	56.9 ± 3.9 &	19	63.8 ± 10.0 *	12
Maximal aerobic power								
VO ₂ max (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	41.6 ± 4.0	10	40.2 ± 6.8	18	41.5 ± 6.6	17	43.6 ± 11.0	10

Ht: height; SJJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power in squat jumps; SJWmax/MML: maximal power in squat jumps per kg of muscle mass in the lower extremities (MML); CMJJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax: maximal power in countermovement jumps; CMJWmax/MML: maximal power in countermovement jumps per kg of muscle mass in the lower extremities; MVC: maximal isometric force in the squatting position; T_{30m} and T_{300m} running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively. * P<0.05 compared to CAG_S+GGN_S, \$ P<0.05 compared to CAG_L+GGN_L, & P<0.05 compared to CAG_L+GGN_S

Legends

Figure 1. Histogram with the distribution of CAG and GGN repeat number in men and women.

Figure 2. CAG repeat polymorphism and height²-adjusted muscle mass of the four extremities (extremities), arms and legs, in women. The black bars represent the group with short CAG polymorphisms (CAG_s) and white bars the group with long CAG (CAG_L) polymorphisms. * P<0.05.

Figure 3. AR polymorphism in women and running speed in 300m. * P<0.05, short CAG polymorphisms (CAG_s) compared to long CAG repeat polymorphism (CAG_L); \$ P<0.05, compared to the group having the combination CAG_L and long GGN repeat polymorphism (GGN_L). GGN_s: short GGN repeat polymorphism.

Figure 4. AR polymorphism and jumping height in men having the combination short CAG repeat polymorphisms (CAG_s) and short GGN repeat polymorphism (GGN_s) compared to those having the combination long CAG repeat polymorphism (CAG_L) and long GGN repeat polymorphism (GGN_L). * P<0.05.

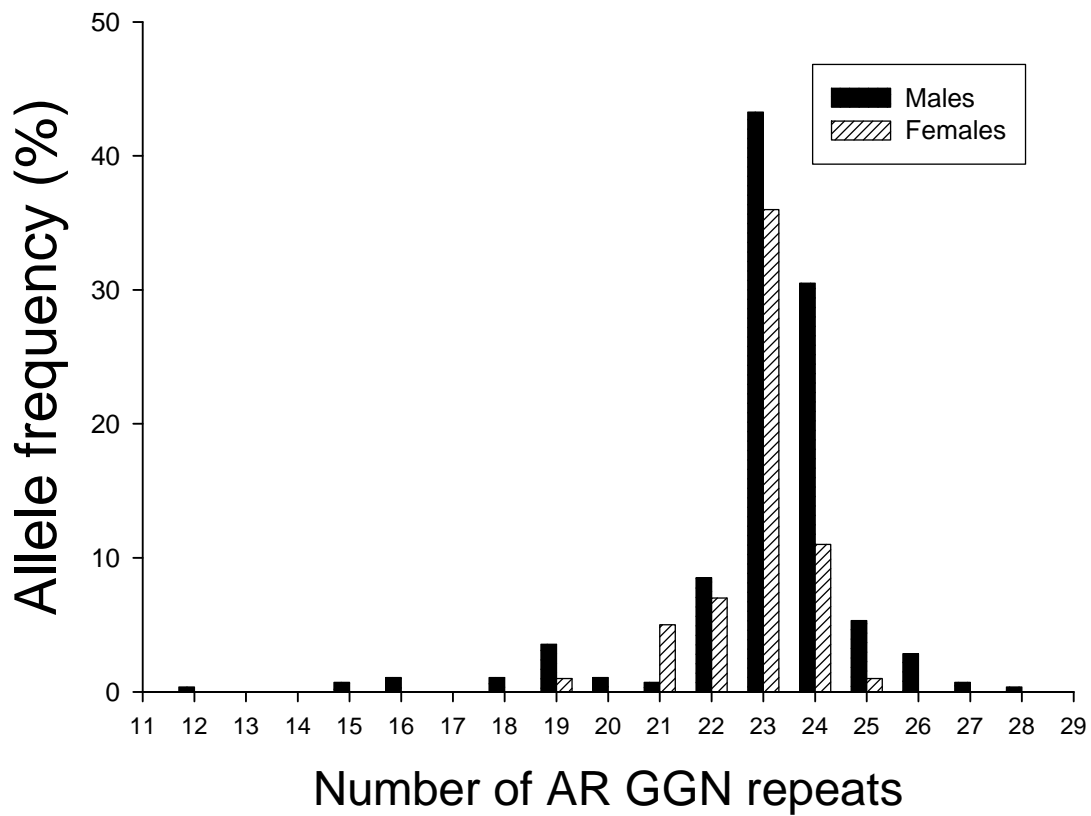
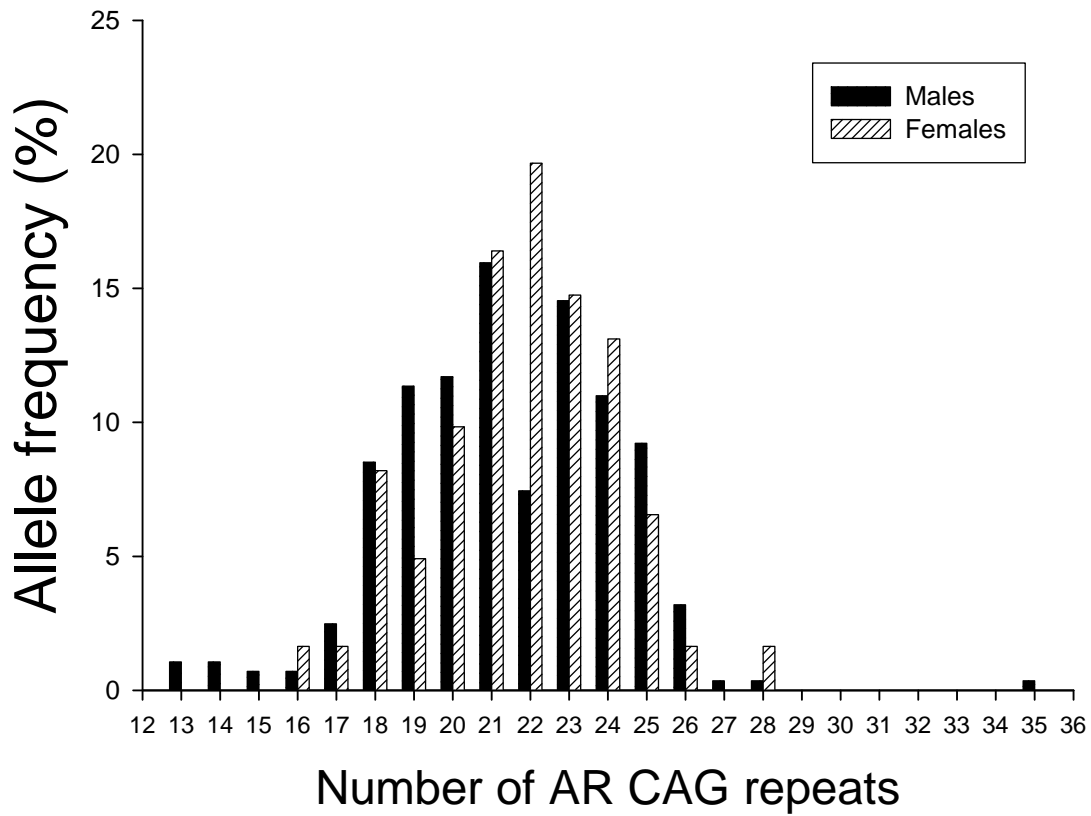


Fig. 1.

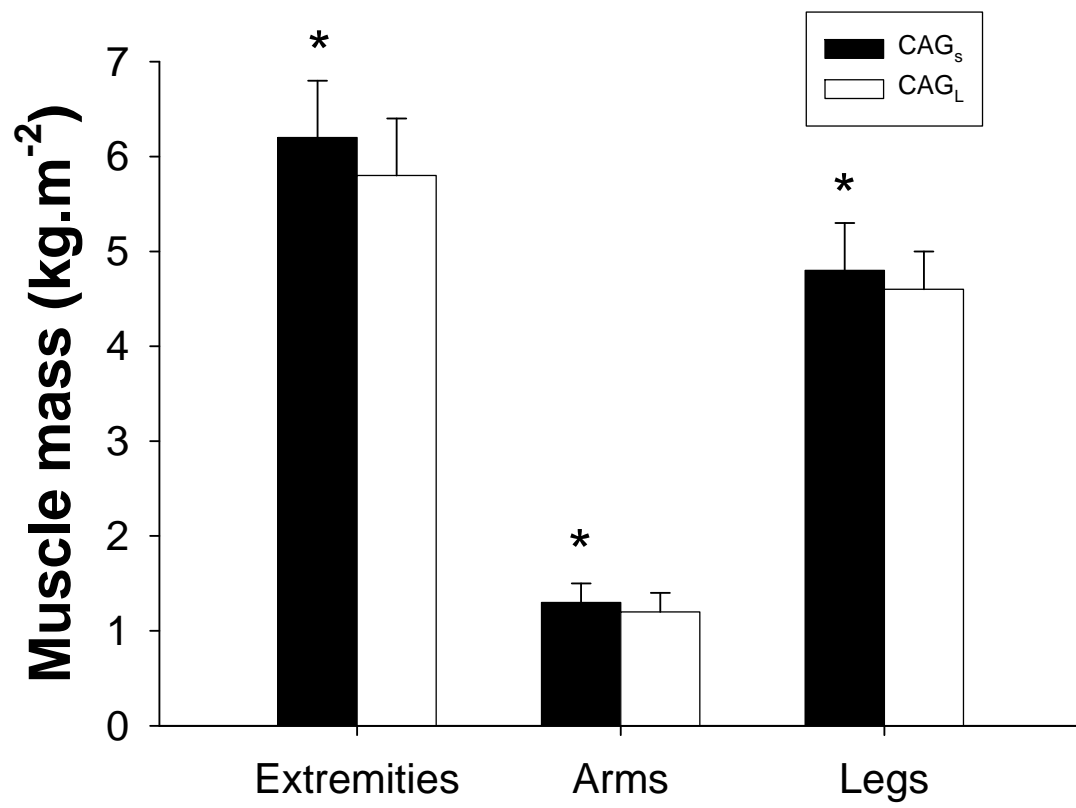


Fig. 2

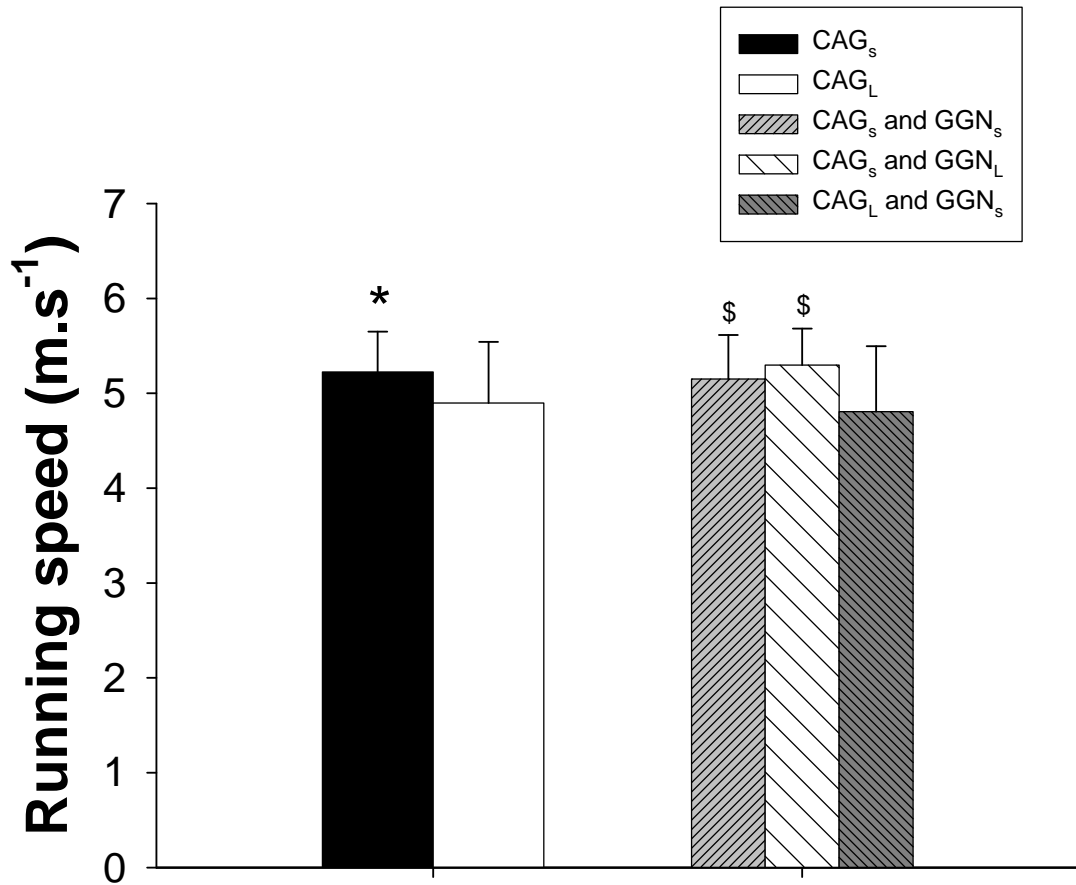


Fig. 3

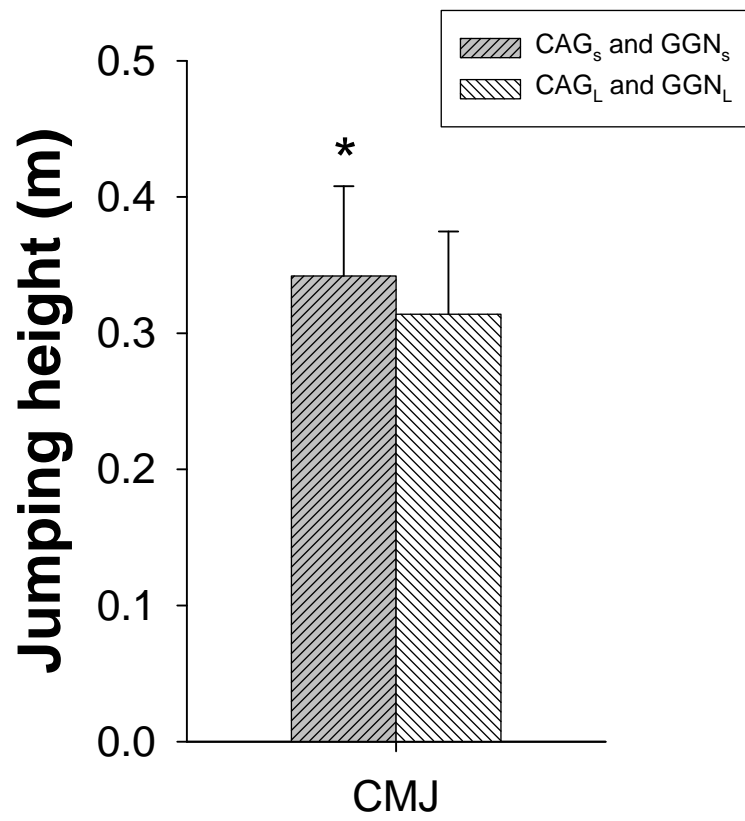


Fig. 4

ESTUDIO IV

Free testosterone, CAG and GGN androgen receptor polymorphisms and bone mass young adults.

Amelia Guadalupe-Grau¹, Francisco German Gonzalez-Rodríguez^{2,3}, Cecilia Dorado¹, Teresa Fuentes¹, Jorge Perez-Gomez, Hugo Olmedillas¹, Joaquin Sanchis Moysi¹, Bonifacio Nicolas Diaz Chico^{2,3}, José 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 Molecular Endocrinology Group, Department of Clinical Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Las Palmas of Gran Canaria-Canary Institute for Cancer Research, Spain

³ Canary Islands Cancer Research Institute (ICIC), Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

Running title: “Androgen receptors and bone mass”

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

e-mail: lopezcalbet@gmail.com

Abstract

Osteoblasts, osteoclasts and osteocytes have androgen receptors (AR) and CAG and GGN polymorphic variations of the AR confer increased androgen sensitivity. We therefore examined whether CAG and GGN repeat polymorphism are associated with serum free testosterone levels and bone mineral content (BMC) and density (BMD) in 282 men (28.6 ± 7.6 years) and 61 women (25.5 ± 6.7 years). Individuals were grouped as CAG short (CAG_s) if harboring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if $CAG > 21$ in men and > 22 in women. GGN was considered short (GGN_s) or long (GGN_L) if $GGN \leq 23$ or > 23 in men and women. In women, there was an inverse correlation between free testosterone and the CAG repeats length ($r = -0.26$, $P = 0.05$). However, neither the CAG nor the GGN repeat length were associated to BMC nor BMD in any of the regions examined. There was, however an interaction between CAG and GGN polymorphisms, such that men and women with $CAG_L + GGN_L$ haplotypes, which potentially have lower androgen responsiveness, have greater BMC and BMD at the lumbar spine than men or women harboring $CAG_s + GGN_s$ haplotypes. However, femoral neck BMD was higher in men with $CAG_s + GGN_s$ compared with $CAG_L + GGN_s$ haplotypes. In contrast to men, women with $CAG_L + GGN_s$ or $CAG_s + GGN_L$ haplotypes have higher BMD than those harboring $CAG_s + GGN_s$ haplotypes. A sex dimorphism was also observed in the upper extremities where women with $CAG_L + GGN_s$ showed higher BMC and BMD than $CAG_s + GGN_s$ women. Multiple regression analysis indicated that in men, free testosterone (FT) accounts for 4.6% of the variability in femoral neck BMD, and CAG repeat length for an additional 1.4%, while the logarithm GGN repeat length ($LgCAG$) was not adding greater predictive capacity to the model (femoral neck BMD = $1.23 + 0.136 \cdot FT - 0.281 \cdot LgCAG$, $R = 0.25$, $P < 0.05$). Thus CAG and GGN androgen receptor polymorphisms have an influence on bone mass and density in healthy adult humans. These effects showed regional and gender specificity, indicating that the relationship between androgen receptor polymorphisms and bone mass is overridden, by other endocrine variables and local factors.

Introduction

Androgen receptor (AR) are expressed in osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes of men and women (1, 2), and both total and free testosterone concentrations are correlated with BMD in postmenopausal (3, 4), but not in premenopausal women (5).

Hypogonadism in men is associated with increased bone turnover and bone loss (6), which is reversed after treatment with androgens (7) and androgen therapy prevents bone loss in postmenopausal women (8). However, conflicting results have been reported regarding the association between testosterone and bone mineral density in aged men (3, 4, 9). In men over age 65 years within the normal range, lower serum testosterone concentrations were not associated with low bone density (4).

Since some polymorphic variations of the AR confer increased androgen sensitivity (10, 11), in theory, differences in the strength of the association between circulating testosterone and bone mass could be explained by differences in the polymorphic variation of the ARs, at least in men (9).

The AR has a variable NH₂-terminal domain that contains two functionally polymorphic microsatellites, a polyglutamine tract encoded by CAG repeats and a polyglycine tract (GGN) encoded by (GGT)₃GGG(GGT)₂(GGC)_n repeats (10). Long CAG repeats are associated with reduced AR transactivation activity and weaker transcriptional potential (10) while androgen responsiveness is increased in cell cultures with short GGN repeats (11). Long polyglutamine repeat (CAG) androgen receptor polymorphism have been associated with femoral neck and lumbar spine BMD in premenopausal (12) and in some studies with postmenopausal women (13), other studies have failed to detect an effect of this polymorphism on BMD or fracture risk (14, 15). Differences in estrogenic status among postmenopausal women may explain a part of these apparent discrepancies (15). An unexplored alternative explanation for the inconsistent relationship between CAG repeat length and BMD is that the influence of CAG repeat polymorphism on BMD is modulated by differences in free testosterone levels or by interaction of CAG with GGN repeat polymorphisms.

Thus we hypothesized that the length of CAG and GGN polymorphism will be inversely associated to BMD in men and women and that CAG and GGN will interact, meaning that men or women harbouring short alleles of both CAG and GGN repeats will have greater BMD.

The main purpose of this study was to find out if in healthy, physically active, premenopausal women and in men of comparable age, BMD is associated with CAG and GGN repeat length and to free serum testosterone concentration. Another aim was to determine if there is an interaction between CAG and GGN repeat polymorphisms and free testosterone in this population.

Methods

Subjects

Two-hundred eighty-two men (age: 28.6 ± 7.6 years; height: 176.8 ± 5.5 cm; body mass: 78.1 ± 10.3 kg; mean \pm SD), and sixty-one women (age: 25.5 ± 6.7 years; height: 165.4 ± 5.8 cm; body mass: 60.7 ± 7.8 kg; mean \pm SD) participated in the study (Table 1). They were recruited between university students, sports clubs and local police officers in Gran Canaria (Spain). The health status of each participant was established by a medical history and physical examination. Subjects taking any kind of medications or having any chronic disease or hypertension were excluded. The study was performed in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as regards the conduct of clinical

research, being approved by the Ethical Committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria. All volunteers provided their written consent before participation in the study.

Blood sampling and body composition analysis

Tests were carried out over four days. The first testing day started with a 20 ml blood sample which was obtained from an antecubital vein in the supine position, between 7.30 and 8.30 a.m. Whole body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (QDR-1500, Hologic Corp., Software version 7.10, Waltham, MA) as reported in Calbet et al. (16).

Serum free testosterone

Serum free testosterone was determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (ELx800 Universal Microplate Reader, Bioteck Instruments Inc, Vermont, USA), using reagent kits from IBL (#DB52181 for free testosterone and #RE52151 for total testosterone, IBL, Hamburg, Germany) and following the manufacturer's instructions. The sensitivity of the free testosterone was 0.17 pg/mL and the intra-assay and inter-assay coefficient variations were 6.1 and 7.8%, respectively.

CAG and GGN repeat polymorphisms

DNA was extracted from blood samples (200 μ l) using High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche Applied Science). To determine the length of the CAG and GGN repeats the corresponding regions located on the exon 1 of the AR gene (Genbank accession no. M27423) were amplified using two pairs of primers whose sequence has been previously reported (32). One primer from each pair was marked with fluorescent dye (FAM or VIC). Amplification was performed in a 25 μ l reaction volume, containing 50 ng of genomic DNA, 200 μ M of each deoxynucleotide triphosphate, 1x Fast Start Taq DNA polymerase Buffer (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 1x GC-rich solution buffer (Roche Applied Science) and 1U of Fast Start Taq DNA polymerase (Roche Applied Science). The concentration of each pair of primers was 1.2 and 1.5 μ M for the amplification of the CAG and GGN repeats, respectively. PCR conditions were: 30 cycles of 95°C for 45 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for 30 sec for CAG amplification; 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 2 min and 72°C for 2 min for GGN amplification. Each PCR was initiated with a denaturation step at 95°C for 5 min and terminated with an extension step at 72°C for 5 min. The PCR product was diluted 1:100 in distilled water and 1 μ l of the dilution was mixed with 10 μ l of formamide and 0.3 μ l of GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, Warrington, UK), denatured at 98°C for 5 min and cooled on ice. Fragment separation was performed by automated capillary electrophoresis, using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the length was determined with Gene Scan Analysis Software (version 3.7) (Applied Biosystems). After analyzing the sequencing results we observed that the capillary electrophoresis-based ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer gave anomalous results when internal standards supplied by the manufacturer were used. Thus, the actual length of the CAG and GGN repeats was underestimated by 4 and 2 repeat units, respectively. Therefore, the allele size estimation in the capillary electrophoresis system was corrected by using a ladder which was created with the actual size obtained after sequencing.

Statistics.

All variables were checked for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. When necessary, the analysis was done on logarithmically transformed data. Since the AR gene is located in the X-chromosome and one of the two alleles is randomly inactivated in women (18), we decided to calculate the mean of two alleles as representative of each pair in women (19, 20). The influence of CAG and GGN repeat lengths on bone mineral content and areal density was determined taking CAG and GGN repeat lengths as either continuous variables or as dichotomous variables with allele cutoff thresholds. Individuals were grouped as CAG short (CAG_s) if harboring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if harboring repeat lengths of > 21 in men and > 22 in women. Subjects were ascribed to the GGN short (GGN_s) group if harboring repeat lengths of ≤ 23 in men and women, otherwise they were included in the GGN long (GGN_L) group. The median value in both genders (male and female), which resulted in the most balanced grouping was used as cutoff threshold. In addition, the subjects were also grouped if having any of the following haplotype combinations: CAG_s+CGN_L, CAG_L+CGN_s, CAG_L+CGN_L and CAG_s+CGN_s (Table 2). Relationships between variables were assessed calculating the Pearson correlation coefficient (r_p) in normally distributed variables, or the Spearman's correlation coefficient (r_s) when variables were not normally distributed.

Given the small number of females included in the study, which could underpowered the statistical analysis we decided to study each gender separately using ANOVA with 2 factors (CAG and GGN lengths), each with two levels (short and long repeat number). In addition, both men and women we determined differences between haplotypes using ANOVA with four different haplotype combinations: CAG_s+CGN_L, CAG_L+CGN_s, CAG_L+CGN_L and CAG_s+CGN_s.

Results

Subject's body composition and anthropometrics is reported in Table 1. There were 69 different haplotypes in the male population and 30 in the female population. Androgen receptor CAG and GGN repeat lengths were not correlated in males (Spearman's correlation = -0.05, P=0.43) nor in women (Spearman's correlation = -0.03, P=0.79), indicating lack of linkage disequilibrium between CAG and GGN microsatellites. Subjects having repeat lengths equal or shorter than the median of the repeat number for the sample studied were considered as harboring the short alleles (i.e., CAG short (CAG_s) and CGN short (CGN_s)), and vice versa, subjects with a repeat number greater than the median were considered as carriers of the long alleles (i.e., CAG long (CAG_L) and CGN long (CGN_L)). The assayed women population showed 12 CAG alleles, ranging from 15 to 26 repeats, fitting with a normal distribution. The most frequent alleles amongst women were 23>22>24 repeats. The male population showed 17 alleles, ranging from 13 to 35 repeats, with a normal distribution. The most frequent alleles in the men's group were 21>23>20 repeats. The GGN repeat showed 6 alleles in women, ranging from 19 to 25 repeats, the most frequent being 23>24 repeats. In men, there were 14 alleles, ranging from 12 to 28 repeats. The GGN repeat did not distribute normally either in men or women.

CAG repeat polymorphism

There was an inverse association between the logarithm of the CAG repeat length and femoral neck BMC, Ward's Triangle BMC and Ward's Triangle BMD in men ($r_p = -0.12$, -0.14 and -0.12 , $P < 0.05$). Women with a longer CAG had 3.5 and 7.0% higher lumbar spine BCM, respectively compared to their counterparts having a shorter CAG

($P = 0.08$ and $P < 0.05$, for men and women respectively). However this effect disappeared after accounting for differences in height. In the other skeletal regions studied, men with CAG_s had BMC and BMD values similar to CAG_L men (Table 2).

In women, the BMC of the upper extremities was 8.8% higher in the long compared to the short CAG group ($P = 0.03$). However, this difference disappeared after accounting for between-subjects differences in height (Table 2).

GGN repeat polymorphism

No associations between GGN length and regional BMC or BMD were observed either in men or women. Regional BMC and BMD were similar between the GGN_s and GGN_L groups, regardless of gender (Table 3).

Interaction between CAG and GGN repeat polymorphisms in men.

Whole body BMC and BMD were similar in the four CAG-GGN haplotypes studied (Fig. 1). Men harboring the combination CAG_L + GGN_L had 6.3% higher lumbar spine BMC than men with the haplotype CAG_s + GGN_s (Fig. 2). Likewise, men with the haplotype CAG_L + GGN_L had 4.4 and 4.3% higher lumbar spine BMD than men harboring the combinations CAG_s + GGN_s and CAG_L + GGN_s, respectively (both $P < 0.05$) (Fig. 2). Men with the combination CAG_s + GGN_s had 13.8, 11.7 and 7.2% higher Ward's Triangle BMC than those with the combinations CAG_L + GGN_L, CAG_s + GGN_L, and CAG_L + GGN_s, respectively (all $P < 0.05$) (Fig. 3). Likewise, Ward's Triangle BMD was 9.8, 7.9 and 6.9% higher in men with CAG_s + GGN_s compared to CAG_L + GGN_L, CAG_s + GGN_L, and CAG_L + GGN_s, respectively (all $P < 0.05$) (Fig. 4). Femoral neck BMD was 4.8% higher in the CAG_s + GGN_s compared with the CAG_L + GGN_s men ($P < 0.05$) (Fig. 4). The mean BMD of the lower extremities was 2.4% higher in the CAG_s + GGN_s compared with the CAG_L + GGN_s men ($P < 0.05$) (Fig. 5).

Interaction between CAG and GGN repeat polymorphisms in women.

Whole body BMC and BMD were similar in the four CAG-GGN haplotypes studied (Fig. 1). Lumbar spine BMC and BMD were 12.3 and 9.4% lower in the CAG_s + GGN_s compared with the CAG_L + GGN_s haplotypes, respectively (both $P < 0.05$) (Fig. 2). CAG_L + GGN_s women had 8.6% higher lumbar spine BMD than CAG_L + GGN_L ($P < 0.05$); and CAG_s + GGN_L had 6.3% greater lumbar spine BMD than CAG_s + GGN_s haplotypes (Fig. 2). Femoral neck BMC was 15.2 and 13.6% higher in CAG_L + GGN_s and CAG_s + GGN_L compared to CAG_s + GGN_s haplotypes ($P < 0.05$) (Fig. 3). Greater trochanter BMC was 22.7% higher in CAG_L + GGN_s than CAG_s + GGN_s haplotypes ($P < 0.05$) (Fig. 3). Femoral neck BMD was 10.9 and 9.1% greater in CAG_s + GGN_L than in CAG_s + GGN_s and CAG_L + GGN_L haplotypes, respectively (both $P < 0.05$) (Fig. 4). Intertrochanteric BMD was 7.5% higher in CAG_s + GGN_L than in CAG_s + GGN_s ($P = 0.05$) The BMC of the upper extremities was 15.0 and 11.3% higher in the CAG_L + GGN_s than CAG_s + GGN_s and CAG_L + GGN_L haplotypes, respectively (both $P < 0.05$). The mean BMD of the upper extremities was 8.2 and 6.2% higher in CAG_L + GGN_s than CAG_L + GGN_L and CAG_s + GGN_s haplotypes, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 5). The mean BMD of the lower extremities tended to be also slightly higher (+4.0%) in CAG_s + GGN_L than CAG_s + GGN_s ($P = 0.08$) (Fig. 5).

Free testosterone bone mass and androgen receptor polymorphism in men

In men there was no relationship between either CAG or GGN repeats length and free testosterone. Moreover, there were non-statistically significant differences in basal serum free testosterone concentrations between CAG_s and CAG_L (21.1 ± 11.3 and 21.1

± 9.7 pmol/L, respectively $P = 0.43$). Although free testosterone concentration was 13% higher in GGN_s compared to GGN_L this difference did not reach statistical significance (22.1 ± 11.2 and 19.6 ± 9.3 pmol/L, respectively, $P = 0.07$). There were significant correlations between the logarithm of free testosterone concentration and BMC at the whole body, Femoral neck, Ward's Triangle, and lower extremities ($r_p = 0.15, 0.21, 0.18,$ and $0.12,$ respectively, $P < 0.05$). The logarithm of free testosterone concentration was also correlated with BMD at the Femoral neck, Intertrochanteric region, Greater trochanter, Ward's Triangle, and lower extremities ($r_p = 0.21, 0.13, 0.20, 0.22,$ and $0.17,$ respectively, all $P < 0.05$).

Multiple regression analysis indicated that in men, free testosterone (FT) accounts for 4.6% of the variability in femoral neck BMD, and CAG repeat length for and additional 1.4%, while the logarithm GGN repeat length (LgCAG) was not adding greater predictive capacity to the model (femoral neck BMD = $1.23 + 0.136 \cdot FT - 0.281 \cdot LgCAG$, $R = 0.25$, $P < 0.05$).

Free testosterone concentrations in men were similar across the four haplotypes (ie, $20.1 \pm 9.1,$ $22.4 \pm 12.4,$ $19.3 \pm 9.5,$ and $21.7 \pm 10.0,$ for CAG_L+CGN_L, CAG_s+CGN_s, CAG_s+CGN_L, and CAG_L+CGN_s, respectively).

Free testosterone bone mass and androgen receptor polymorphism in women

In women, there was an inverse correlation between free testosterone and the CAG repeats length ($r_p = -0.26$, $P = 0.05$). However, there was non-statistically significant differences in basal serum free testosterone concentrations between CAG_s and CAG_L haplotypes (3.8 ± 1.9 and 3.6 ± 1.8 pmol/L, respectively $P = 0.70$) and between GGN_s and GGN_L haplotypes (3.9 ± 2.1 and 3.7 ± 1.6 pmol/L, respectively $P = 0.65$). No relationship was observed between BMC or BMD and basal serum free testosterone concentrations neither at the whole body level nor at regional sites in women.

In women with CAG_L haplotypes the inverse association between free testosterone concentration and CAG repeats length was stronger ($r_s = -0.62$, $n=21$, $P < 0.01$). Free testosterone concentration correlated inversely with height in CAG_L haplotypes ($r_s = -0.41$, $n=21$, $P < 0.05$). In women with a GGN_L haplotype there was a correlation between free testosterone concentration and femoral neck BMC ($r = 0.47$, $n=31$, $P = 0.01$), and BMD at the femoral neck and greater trochanter ($r = 0.40$ and 0.36 , respectively, $n = 31$, $P < 0.05$).

In women with the haplotype CAG_L + GGN_L, the logarithm of free testosterone concentration correlated with the BMD of the upper extremities and CAG repeat length ($r_p = 0.67$ and -0.63 , $n=10$, $P < 0.05$). Free testosterone concentrations in women were also similar across the four haplotypes.

Discussion

This study indicates that androgen receptor polymorphisms have an influence on bone mass and density in healthy adult humans. These effects showed regional and gender specificity, indicating that the relationship between androgen receptor polymorphisms and bone mass is modulated, and in some instances override, by other endocrine variables and local factors. In men, there is an inverse association between CAG repeat length and femoral neck BMC and BMD. In women, neither the CAG nor the GGN repeat length were associated to BMC nor BMD in any of the regions examined. However, the most interesting aspect of this study is that it shows that there is an interaction between the CAG and GGN polymorphisms and bone mass. In contrast with our hypothesis, men and women with CAG_L + GGN_L haplotypes, which potentially

have lower androgen responsiveness, have greater BMC and BMD at the lumbar spine than men or women harboring CAG_s + GGN_s haplotypes. However, femoral neck BMD was higher in men with CAG_s + GGN_s compared with CAG_L + GGN_s haplotypes. More importantly, serum free testosterone accounts for 4.6% of the variability in femoral neck BMD and CAG repeat length for another 1.4%, such that men with higher levels of free testosterone a shorter CAG length have greater femoral neck BMD. In contrast to men, women with CAG_L + GGN_s or CAG_s + GGN_L haplotypes have higher BMD than those harboring CAG_s + GGN_s haplotypes. A sex dimorphism was also observed in the upper extremities where women with CAG_L + GGN_s showed higher BMC and BMD than CAG_s + GGN_s women. In men, CAG and GGN haplotypes had no significant influence on BMC and BMD of the extremities.

Although free testosterone levels were not influenced by the CAG and GGN repeat length in men, in women there was an inverse association between serum free testosterone concentration and CAG repeat length.

Bone mass and androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphism

When CAG and GGN polymorphism were considered separately, after adjusting for height, no association between CAG and GGN length and bone mineral density was observed in the present investigation, regardless of gender. The influence of GGN repeat AR polymorphism has not been studied previously and, hence, we can not compare with other studies. Conflicting results have been reported regarding the influence of CAG repeat length on BMD. For example, lack of association between CAG repeat length and BMD has been reported in middle aged (21) aged men (22), and postmenopausal women (13-15, 23). However, a positive correlation between BMD of the lumbar spine and femoral neck with length of the CAG repeat polymorphism has also been reported in men over 40 years (9, 13), whilst the opposed was observed in postmenopausal women with long CAG repeat polymorphism (13). In premenopausal, but not in postmenopausal, Japanese women, Yamada et al. found an inverse association between CAG repeat length with lumbar spine BMD and the whole body BMD was lower in women with two (CAG)_{n≥23} alleles than in those with one or two (CAG)_{n≤22} alleles.(24).

In contrast to Langdahl et al. (13) and in agreement with our study, Sowers et al. observed that in women aged 28-48 years with a femoral neck BMD in the lowest quintile of the study population had a higher presence of short CAG repeat length genotypes in both alleles (12). This pattern of proportionate genotypic over-representation was also observed in spine and total body BMD levels and in baseline serum osteocalcin levels (12).

Some of these discrepancies just reflect the polygenic nature of the genetic influence on bone mass and the impact of a number of factors, such as, age, gender, nutrition, race, life style, mechanical loading, skeletal region under consideration among others, which are known to influence bone metabolism (4, 25-28). This is further underline by the fact that even studies in the same population, for example Scandinavians, but carried out in different countries have yield different results (9, 13, 14, 21). Moreover, in the studies in which an association have been found between CAG repeat length polymorphism and BMD, its strength has consistently been rather low, i.e., CAG repeat length polymorphism can only explain a rather small part of the variance in BMD, and only in some specific regions. Thus, other factors influencing BMD prevail on CAG repeat polymorphism in many instances.

Free testosterone and androgen receptor polymorphism

Previous studies have reported lack of correlation between CAG repeat number and free testosterone in middle-aged (9, 29) and aged men (22). The present investigation shows that also in young male adults there is no association between CAG or GGN length and free testosterone levels. As expected there was a positive association between free testosterone levels and bone mass and density in men (3). However, only in women with long GGN repeat androgen receptor polymorphisms was there an association between free testosterone and bone mass.

Interestingly, an interaction between serum testosterone levels and CAG repeat length and femoral BMD has been recently reported in healthy Swedish men (9). These authors observed that men having the combination of low free testosterone and shorter CAG repeat length had the lower femoral neck BMD (9). In the present investigation we have confirmed this interaction between free testosterone, CAG repeat length and femoral neck BMD. However, our results only agree partly with those of Stiger et al. (9). We observed a positive association between free testosterone and BMD like Stiger et al., however in our study the effect of testosterone on femoral BMD appeared to be accentuated in the men having shorter CAG, was is the opposed of what was found by Stiger et al. (9). A part from the different age of the populations, racial and environmental differences could also explain the discrepancies.

The negative correlation observed in the present in study between free testosterone and CAG repeat length is similar to that reported with serum androstenedione ($r = -0.21$) and total testosterone concentrations ($r = -0.20$) in women aged from 34 to 55 years, with different menstrual status (20). Westerberg et al. (30) reported that women harboring two short alleles had higher calculated free testosterone concentrations than those having two long alleles.

Our CAG numbers represented bi-allelic means, and the presence in one of the two alleles of a CAG repeat number below 17 may have been shown to be associated with reduced calculated free testosterone levels (30). The latter implies that the influence of CAG repeat length on free testosterone is not linear, as also reflected by the negative correlation observed in the present investigation between the logarithm of free testosterone and CAG number. Thus, our results give support to the concept that women with a low CAG repeat number free testosterone concentration is increased, and vice versa. However, our data also show a closest inverse correlation between free testosterone and CAG number in the women having a mean bi-allelic CAG number above 22. This inverse relationship gives support for the idea that the androgen receptors exert a stimulatory influence on androgen production, such that women with lower activity receptors would have slightly reduced androgen concentrations (30). In fact, administration of androgen receptor antagonist reduces androgen production in women (31), likely in the ovary (20).

In contrast, Hietala et al. (32) reported no correlation between the mean lengths of the CAG or GGC repeats and testosterone levels among oral contraceptive users or non-users. Neither homozygosity nor the phase of the menstrual cycle or the use of oral contraceptives had an influence on total testosterone concentrations (32).

The influence of the GGN repeat AR polymorphism on free testosterone has only been studied by Hietala et al. (32). In agreement with our results, Hietala et al. reported no relationship between testosterone and GGN repeat number in women not taking oral contraceptives (32). However, among oral contraceptive users, lower testosterone levels were observed in the follicular phase (days 5-10) of the menstrual

cycle of women with two long GGC alleles (32), but not in the mid luteal phase (days 18-23).

In summary this study shows that CAG and to lesser extend GGN androgen receptors polymorphism have an influence on bone mass and bone mineral density, which is modulated depending a number of factors among which free testosterone concentration play a relevant role in young men, but not in young women. Our data also provide evidence for an interaction between the two microsatellites, which also shows some gender and regional singularities.

Acknowledgments

The study was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56076-C06-04/ACTI) and FEDER. Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias (2006/179 0001 and FEDER). Proyecto Interreg IIB BIOPOLIS, Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC), Cabildo de Gran Canaria, Cabildo de Tenerife and La Caja de Canarias. The authors thank José Navarro de Tuero for his excellent technical assistance.

References

1. **Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE** 1997 The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3493-3497
2. **Pederson L, Kremer M, Judd J, Pascoe D, Spelsberg TC, Riggs BL, Oursler MJ** 1999 Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:505-510
3. **Greendale GA, Edelstein S, Barrett-Connor E** 1997 Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 12:1833-1843
4. **Slemenda CW, Longcope C, Zhou L, Hui SL, Peacock M, Johnston CC** 1997 Sex steroids and bone mass in older men. Positive associations with serum estrogens and negative associations with androgens. *J Clin Invest* 100:1755-1759
5. **Sowers MR, Finkelstein JS, Ettinger B, Bondarenko I, Neer RM, Cauley JA, Sherman S, Greendale GA** 2003 The association of endogenous hormone concentrations and bone mineral density measures in pre- and perimenopausal women of four ethnic groups: SWAN. *Osteoporos Int* 14:44-52
6. **Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM, Greenspan SL, Rosenthal DI, Crowley WF, Jr.** 1987 Osteoporosis in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Ann Intern Med* 106:354-361
7. **Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM, Doppelt SH, Rosenthal DI, Segre GV, Crowley WF, Jr.** 1989 Increases in bone density during treatment of men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 69:776-783
8. **Johansen JS, Hassager C, Podenphant J, Riis BJ, Hartwell D, Thomsen K, Christiansen C** 1989 Treatment of postmenopausal osteoporosis: is the anabolic steroid nandrolone decanoate a candidate? *Bone and mineral* 6:77-86
9. **Stiger F, Brandstrom H, Gillberg P, Melhus H, Wolk A, Michaelsson K, Kindmark A** 2008 Association Between Repeat Length of Exon 1 CAG Microsatellite in the Androgen Receptor and Bone Density in Men is Modulated by Sex Hormone Levels. *Calcif Tissue Int*
10. **Lee DK, Chang C** 2003 Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4043-4054
11. **Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER** 2005 Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *The Prostate* 62:133-139
12. **Sowers M, Willing M, Burns T, Deschenes S, Hollis B, Crutchfield M, Jannausch M** 1999 Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels. *J Bone Miner Res* 14:1411-1419
13. **Langdahl BL, Stenkjaer L, Carstens M, Tofteng CL, Eriksen EF** 2003 A CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene is associated with reduced bone mass and increased risk of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 73:237-243
14. **Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kroger H, Komulainen M, Pallonen H, Saarikoski S, Honkanen R, Maenpaa PH** 2003 Relation of androgen receptor gene polymorphism to bone mineral density and fracture risk in early

- postmenopausal women during a 5-year randomized hormone replacement therapy trial. *J Bone Miner Res* 18:319-324
15. **Retornaz F, Paris F, Lumbroso S, Audran F, Tigoulet F, Michelon C, Jeandel C, Sultan C, Blain H** 2006 Association between androgen receptor gene polymorphism and bone density in older women using hormone replacement therapy. *Maturitas* 55:325-333
 16. **Calbet JA, Dorado C, Diaz-Herrera P, Rodriguez-Rodriguez LP** 2001 High femoral bone mineral content and density in male football (soccer) players. *Med Sci Sports Exerc* 33:1682-1687
 17. **Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R, Falcon O, Jr., Diaz BP, Rivero JF, Perucho M, Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC** 2006 Alleles with short CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *International journal of cancer* 118:1420-1425
 18. **Lyon MF** 1999 X-chromosome inactivation. *Curr Biol* 9:R235-237
 19. **Gonzalez A, Javier Dorta F, Rodriguez G, Brito B, Rodriguez MA, Cabrera A, Diaz-Chico JC, Reyes R, Aguirre-Jaime A, Nicolas Diaz-Chico B** 2007 Increased risk of breast cancer in women bearing a combination of large CAG and GGN repeats in the exon 1 of the androgen receptor gene. *Eur J Cancer* 43:2373-2380
 20. **Jaaskelainen J, Korhonen S, Kuulasmaa T, Kurl S, Niskanen L, Vanhala M, Hippelainen M, Voutilainen R, Heinonen S** 2008 Androgen receptor gene CAG repeat length in women with metabolic syndrome. *Gynecol Endocrinol* 24:411-416
 21. **Remes T, Vaisanen SB, Mahonen A, Huuskonen J, Kroger H, Jurvelin JS, Penttila IM, Rauramaa R** 2003 Aerobic exercise and bone mineral density in middle-aged finnish men: a controlled randomized trial with reference to androgen receptor, aromatase, and estrogen receptor alpha gene polymorphisms small star, filled. *Bone* 32:412-420
 22. **Van Pottelbergh I, Lumbroso S, Goemaere S, Sultan C, Kaufman JM** 2001 Lack of influence of the androgen receptor gene CAG-repeat polymorphism on sex steroid status and bone metabolism in elderly men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:659-666
 23. **Tofteng CL, Kindmark A, Brandstrom H, Abrahamsen B, Petersen S, Stiger F, Stilgren LS, Jensen JE, Vestergaard P, Langdahl BL, Mosekilde L** 2004 Polymorphisms in the CYP19 and AR genes--relation to bone mass and longitudinal bone changes in postmenopausal women with or without hormone replacement therapy: The Danish Osteoporosis Prevention Study. *Calcif Tissue Int* 74:25-34
 24. **Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H** 2005 Association of polymorphisms of the androgen receptor and klotho genes with bone mineral density in Japanese women. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83:50-57
 25. **Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S** 1987 Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest* 80:706-710
 26. **Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston CC, Jr.** 1991 Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 6:561-567

27. **Soroko SB, Barrett-Connor E, Edelstein SL, Kritz-Silverstein D** 1994 Family history of osteoporosis and bone mineral density at the axial skeleton: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 9:761-769
28. **Vicente-Rodriguez G, Dorado C, Ara I, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Calbet JA** 2007 Artistic versus rhythmic gymnastics: effects on bone and muscle mass in young girls. *Int J Sports Med* 28:386-393
29. **Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M, Longcope C, McKinlay JB, Kantoff PW** 1999 Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *J Endocrinol* 162:137-142
30. **Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, Hellstrand M, Landen M, Jansson M, Holm G, Bjorntorp P, Eriksson E** 2001 Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2562-2568
31. **Venturoli S, Marescalchi O, Colombo FM, Macrelli S, Ravaioli B, Bagnoli A, Paradisi R, Flamigni C** 1999 A prospective randomized trial comparing low dose flutamide, finasteride, ketoconazole, and cyproterone acetate-estrogen regimens in the treatment of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1304-1310
32. **Hietala M, Sandberg T, Borg A, Olsson H, Jernstrom H** 2007 Testosterone levels in relation to oral contraceptive use and the androgen receptor CAG and GGC length polymorphisms in healthy young women. *Human reproduction (Oxford, England)* 22:83-91

Figure legends

Fig. 1. Whole body bone mineral content (BMC) and bone mineral areal density (BMD) in men and women. Subjects were grouped as CAG short (CAG_s) if harboring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if harboring repeat lengths of > 21 in men and > 22 in women. The cut off point for GGN short (GGN_s) was GGN repeat polymorphism ≤ 23 in men and women, otherwise subjects were included in the GGN long (GGN_L) group. Four haplotypes combinations were defined as: CAG_L + GGN_L, CAG_s + GGN_s, CAG_s + GGN_L, and CAG_L + GGN_s.

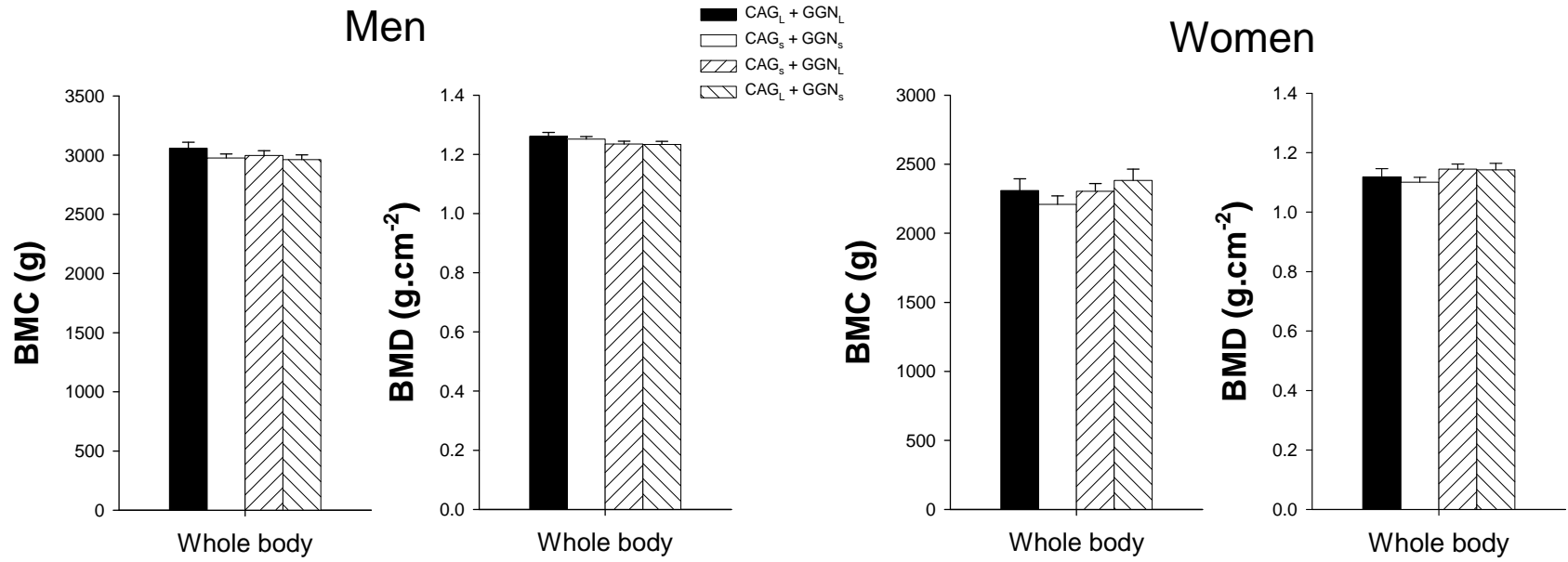
Fig. 2. Mean lumbar spine (from L₂, L₃ and L₄) bone mineral content (BMC) and bone mineral areal density (BMD) in men and women. Subjects were grouped as CAG short (CAG_s) if harboring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if harboring repeat lengths of > 21 in men and > 22 in women. The cut off point for GGN short (GGN_s) was GGN repeat polymorphism ≤ 23 in men and women, otherwise subjects were included in the GGN long (GGN_L) group. Four haplotypes combinations were defined as: CAG_L + GGN_L, CAG_s + GGN_s, CAG_s + GGN_L, and CAG_L + GGN_s. * P < 0.05 compared to CAG_s + GGN_s; § P < 0.05 compared to CAG_L + GGN_s

Fig. 3. Hip bone mineral content (BMC) in men and women. Subjects were grouped as CAG short (CAG_s) if harboring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if harboring repeat lengths of > 21 in men and > 22 in women. The cut off point for GGN short (GGN_s) was GGN repeat polymorphism ≤ 23 in men and women, otherwise subjects were included in the GGN long (GGN_L) group. Four haplotypes combinations were defined as: CAG_L + GGN_L, CAG_s + GGN_s, CAG_s + GGN_L, and CAG_L + GGN_s. * P < 0.05 compared to CAG_s + GGN_s; § P < 0.05 compared to CAG_L + GGN_s

Fig. 4. Hip bone mineral areal density (BMD) in men and women. Subjects were grouped as CAG short (CAG_s) if harboring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if harboring repeat lengths of > 21 in men and > 22 in women. The cut off point for GGN short (GGN_s) was GGN repeat polymorphism ≤ 23 in men and women, otherwise subjects were included in the GGN long (GGN_L) group. Four haplotypes combinations were defined as: CAG_L + GGN_L, CAG_s + GGN_s, CAG_s + GGN_L, and CAG_L + GGN_s. * P < 0.05 compared to CAG_s + GGN_s; § P < 0.05 compared to CAG_L + GGN_s, § P < 0.05 compared to CAG_L + GGN_L.

Fig. 5. Bone mineral content (BMC) and areal bone mineral density of the upper and lower extremities, in men and women. Subjects were grouped as CAG short (CAG_s) if harboring repeat lengths of ≤ 21 in men and ≤ 22 in women, and CAG long (CAG_L) if harboring repeat lengths of > 21 in men and > 22 in women. The cut off point for GGN short (GGN_s) was GGN repeat polymorphism ≤ 23 in men and women, otherwise subjects were included in the GGN long (GGN_L) group. Four haplotypes combinations were defined as: CAG_L + GGN_L, CAG_s + GGN_s, CAG_s + GGN_L, and CAG_L + GGN_s. * P < 0.05 compared to CAG_s + GGN_s; § P < 0.05 compared to CAG_L + GGN_L.

Fig. 1



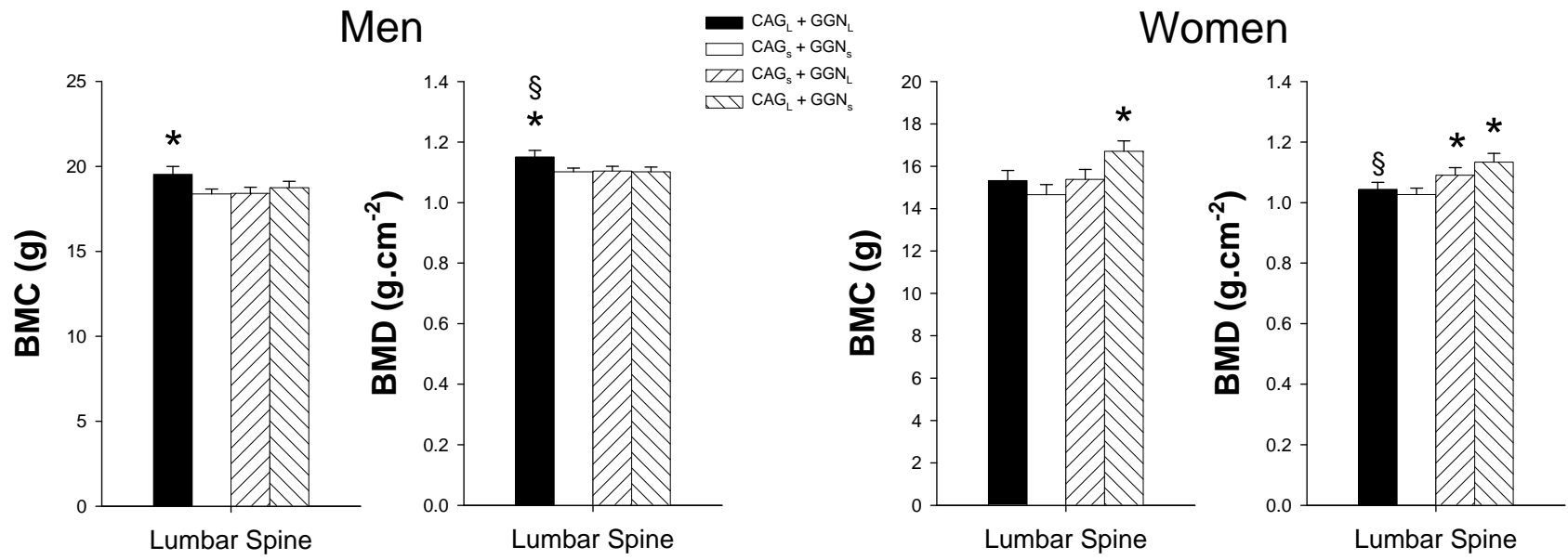


Fig. 2

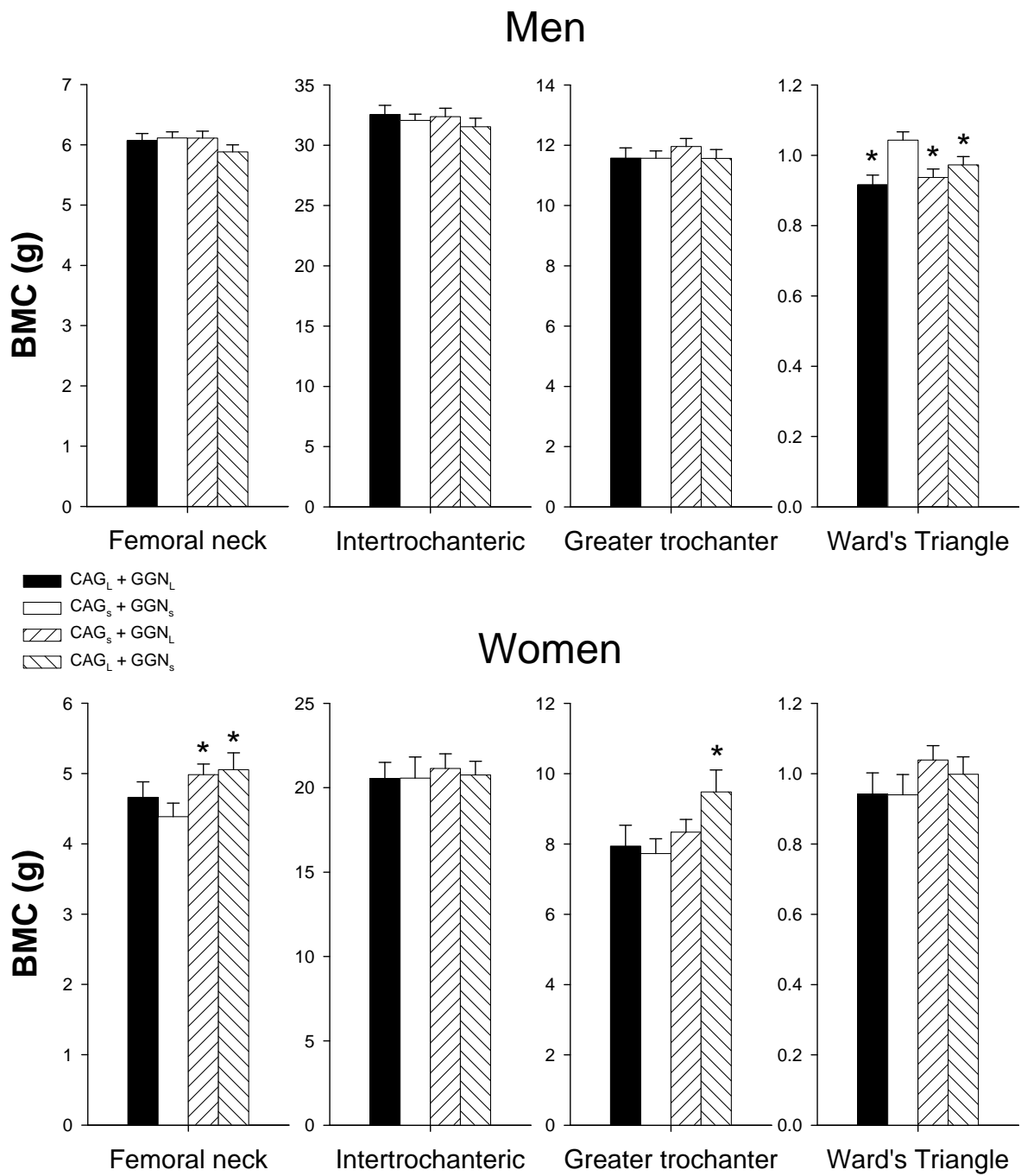


Fig. 3

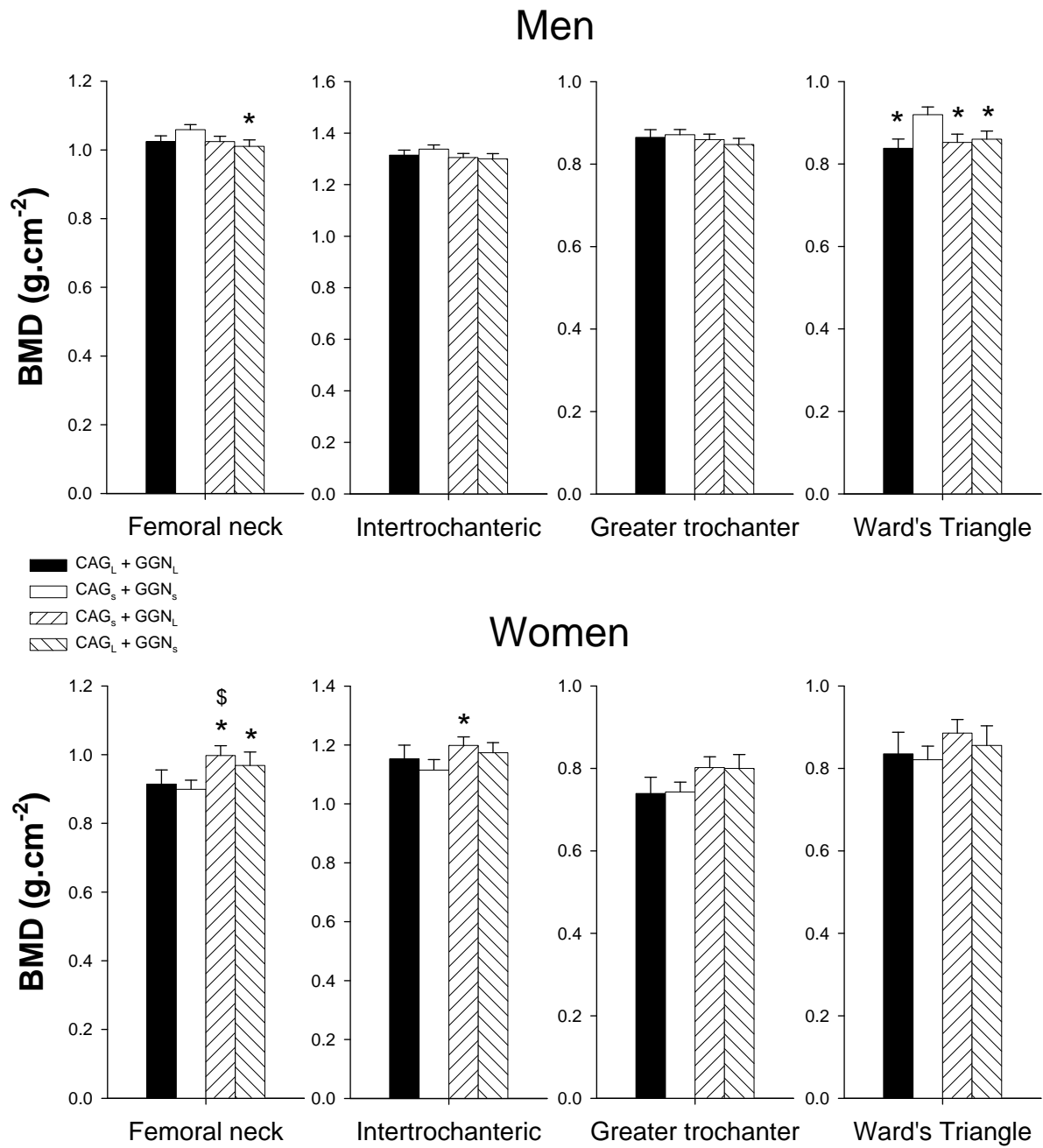


Fig. 4

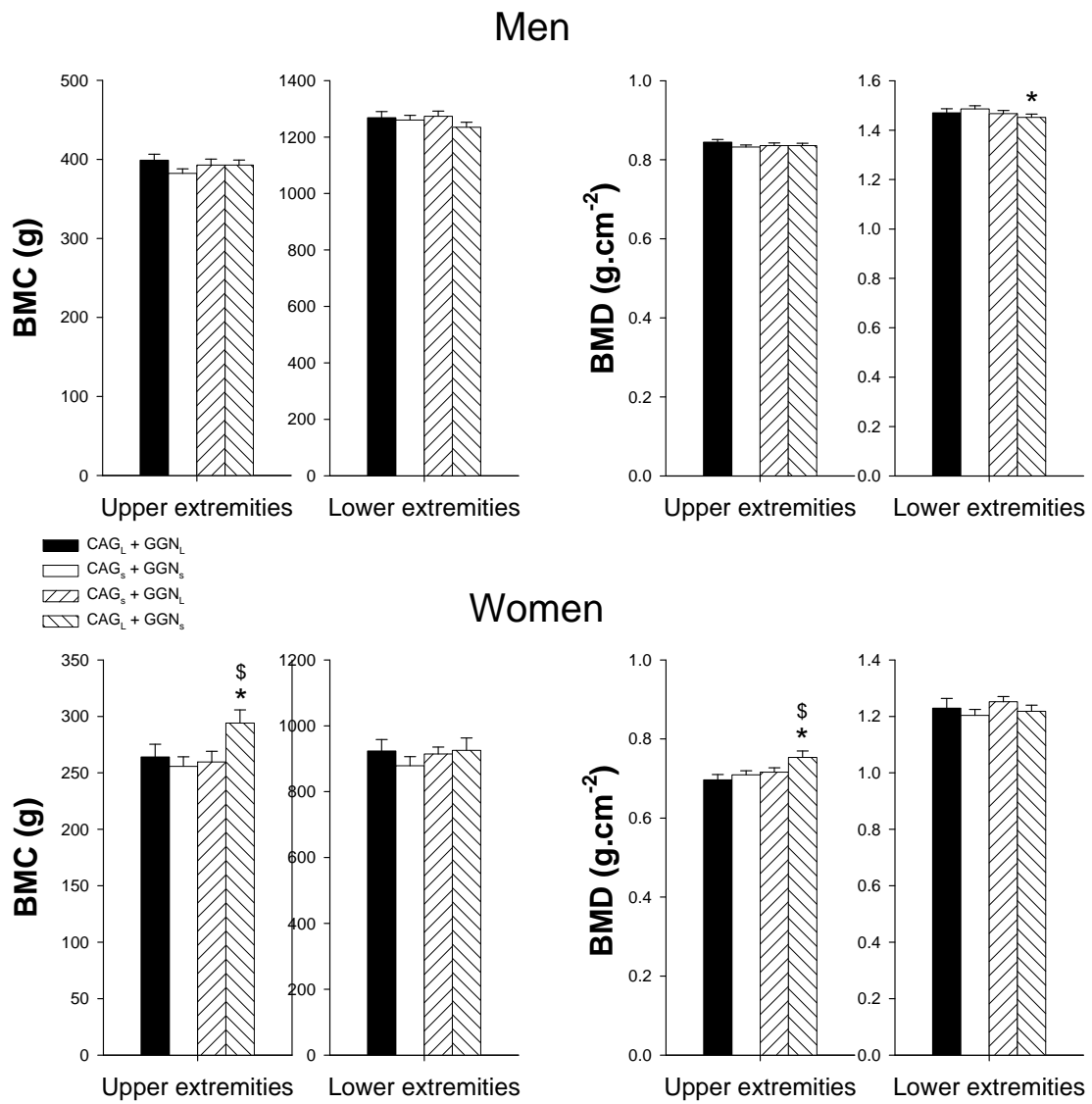


Fig. 5.