

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

## **CERTIFICA,**

Que la Comisión de Investigación del Departamento en su sesión de fecha 22 de septiembre de 2011, 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 grasa corporal y la respuesta lipolítica al ejercicio*" presentada por el doctorando D. Jesús Gustavo Ponce González y dirigida por los doctores D. José A. López Calbet, D<sup>a</sup>. Cecilia Dorado García y D<sup>a</sup>. Amelia Guadalupe Grau.

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 veintiséis de septiembre de dos mil once.



The image shows a handwritten signature in blue ink over a circular official stamp. The stamp is light blue and contains the text "DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN FÍSICA" around the perimeter and "UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA" in the center. The signature is written in a cursive style.



# TESIS DOCTORAL



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 GRASA CORPORAL Y LA RESPUESTA LIPOLÍTICA AL EJERCICIO."***

Tesis Doctoral presentada por D. Jesús Gustavo Ponce González

Dirigida por:

Dr. D. José Antonio López Calbet (C.U.)

Dra. D<sup>a</sup>. Cecilia Dorado García (C.U.)

Dra. D<sup>a</sup>. Amelia Guadalupe Grau

***Los Directores***

***El Doctorando***

En Las Palmas de Gran Canaria a 26 de Septiembre de 2011.



## CONTENIDOS

<b>Prólogo y agradecimientos</b> .....	3
<b>Lista de publicaciones originales</b> .....	5
<b>Fuentes de financiación</b> .....	8
<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>Resumen general</b> .....	11
<b>Summary</b> .....	17
<b>1. Introducción</b> .....	21
1.1. Ácidos grasos .....	25
1.1.1. <i>Oxidación de ácidos grasos durante el ejercicio</i> .....	26
1.1.2. <i>Oxidación mitocondrial</i> .....	33
1.1.3. <i>Factores determinantes de la oxidación de grasas</i> .....	37
1.1.4. <i>Calorimetría indirecta</i> .....	43
1.2. Perfil hormonal y masa grasa .....	46
1.2.1. <i>Osteocalcina</i> .....	47
1.2.2. <i>Andrógenos</i> .....	48
1.2.3. <i>Leptina</i> .....	49
1.2.4. <i>Dimorfismo sexual</i> .....	55
1.3. Receptor de andrógenos y masa grasa.....	56
1.3.1. <i>Polimorfismo del receptor de andrógenos</i> .....	57
<b>2. Objetivos</b> .....	63
<b>3. Hipótesis</b> .....	64
<b>4. Metodología</b> .....	67
4.1. Sujetos .....	67
4.2. Composición corporal .....	69
4.3. Capacidad de salto.....	69
4.4. Capacidad anaeróbica.....	69

4.5. Test de velocidad de carrera .....	70
4.6. Test de oxidación máxima de grasas (MFO): calorimetría indirecta .....	70
4.7. Test de tolerancia a la glucosa.....	71
4.8. Biopsia muscular .....	71
4.8.1. <i>Análisis bioquímico</i> .....	72
4.8.2. <i>Análisis mediante la técnica de Western blot</i> .....	72
4.8.3. <i>Análisis histoquímico</i> .....	74
4.8.4. <i>Protocolo de medición de la respiración mitocondrial</i> .....	75
4.9. Muestras de sangre .....	75
4.9.1. <i>Análisis de sangre y determinaciones hormonales</i> .....	75
4.9.2. <i>Aislamiento de ADN sanguíneo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la medición de los polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos</i> .....	76
4.10.    Consentimientos y aprobación ética.....	77
4.11.    Estadística .....	77
<b>5. Resultados</b> .....	79
5.1. Resumen de los resultados del artículo I (Ara et al. 2010).....	81
5.2. Resumen de los resultados del artículo II (Ponce-González et al. 2011) .....	83
5.3. Resumen de los resultados del artículo III (Ponce-González et al. 2011) ....	84
<b>6. Discusión</b> .....	89
<b>7. Conclusiones</b> .....	101
<b>8. Bibliografía</b> .....	105



## Agradecimientos

Puedo decir que este es el apartado de la tesis en el que he necesitado más tiempo para realizarlo, ya que son tantos los agradecimientos que son difíciles de resumir.

Comenzaré por recordar cuando aún estaba en la carrera, ya que hubo un punto de inflexión en mi formación antes y después de la asignatura de Fisiología del Ejercicio. Un profesor llamado **López Calbet** despertaba en mí la curiosidad de querer saber más cada día, además de abrirme los ojos sobre la realidad (llegaba a quinto de carrera y no tenía idea de nada). Gracias por permitirme trabajar a tu lado, abrirme tus grandes fuentes de conocimiento, enseñarme lo que significa el mundo de la investigación y sobre todo por haber confiado en mí para integrarme en la familia que forma el grupo de investigación de Rendimiento Humano, donde cada día que pasa aprendes mil nuevos conocimientos y valores que me acompañarán a lo largo de mi carrera profesional y personal.

Gracias a **Cecilia Dorado**, quién desde el principio (primero de carrera) me enseñó que con esfuerzo se puede conseguir todo lo que te propones (incluso un mortal). El haberme apoyado desde el principio, permitió que pudiera aprender y trabajar con **Joaquín Sanchís**. Juntos, me ayudaron a escoger cómo dar los primeros pasos en mi carrera profesional, siendo una motivación para mí el llegar a estar a vuestra altura algún día.

Una vez en el grupo de investigación de Rendimiento Humano, dar gracias a la suerte, de ponerme a trabajar bajo la tutela de **Borja Guerra**, que en calidad de jefe, es uno de los grandes responsables de mi progresión en el laboratorio, y en calidad de amistad siempre me ha prestado su ayuda incondicional guiándome cada vez que no encontraba el camino. Gracias por todo, siempre te consideraré como uno de mis directores de tesis.

A **Amelia Guadalupe**, ya que gran parte de los datos que se recogen en esta tesis han sido generados y tratados por ella. Gracias por ayudarme y por tus explicaciones polimórficas.



Agradecer de corazón a **Teresa Fuentes**, por hacerme tan fácil la entrada en el laboratorio, enseñarme lo eficiente que se puede llegar a ser (estoy en ello), por el buen trabajo en equipo, compartir la experiencia de tantos congresos y por ayudarme siempre que lo he necesitado como una buena amiga. Muchas gracias.

No entiendo mi etapa en el laboratorio sin mi padrino/tutor/amigo **Hugo Olmedillas**, quién siempre tengo en mente en mis acciones dentro del laboratorio, intentando parecerme a él en todo lo posible. Mis problemas e inquietudes en el laboratorio siempre han sido más llevaderos gracias a tu ayuda infinita.

Mil gracias al inspector **José Navarro**, quién a lo largo de estos años también ha hecho de motivador, siendo el mejor guía en los momentos más difíciles, ayudándome siempre a encontrar el camino correcto. GRACIAS POR TODO.

A **Nacho Ara**, por permitirme participar en el estudio de los post-obesos de Dinamarca, y sobre todo por remarcar que la humildad es un valor indispensable para seguir creciendo.

**Alfredo Santana**, gracias por enseñarme a trabajar meticulosamente en un laboratorio, haciéndome progresar en técnicas de biología molecular, como si fuera tu doctorando. Espero poder seguir aprendiendo de tus conocimientos.

A **David Morales**, quien ha querido siempre compartir conmigo todas y cada una de sus inquietudes, importantes o no, desde la carrera hasta el doctorado, hace ya 10 años. Gracias por tu ayuda.

Agradecer a **Lorena Rodríguez**, quién siempre tiene una buena cara pase lo que pase, haciendo más llevadero todo el trabajo. Gracias por tu amistad.

A **Rafael Sánchez**, quién me ha introducido de pleno en el campo de la fatiga. Gracias por tu gran disponibilidad y ayuda siempre que lo he necesitado.

Gracias a **José Losa**, por tu gran trabajo desarrollado hasta la fecha, acompañado siempre por tu humildad y amigabilidad. Tu límite no tiene techo.

Por tu gran amabilidad y colaboración en el laboratorio, gracias **Macame**.





Por traer energía renovada al laboratorio cargada de positivismo, gracias al trío del Máster en León, inolvidable para mí, **Luke, Perico e Ismael**. Al igual que pasó con **Marta y Andrea** durante sus meses de estancia en el laboratorio.

Agradecer a **Eli**, por su gran colaboración en todo momento hasta la fecha.

A **José Guillén**, gracias por ayudarme en nuestro primer año de laboratorio.

A **Ana**, por hacerme partícipe de tu estudio de Pilates, y ser tan comprensible.

Gracias al resto de profesores miembros del grupo de investigación de Rendimiento Humano, **Rafael Arteaga, Javier Chavarren, José Antonio Serrano, Juan José González**.

Gracias a **Bonifacio Nicolás Díaz Chico**, por su magnífica gestión en la medición de los polimorfismos del receptor de andrógenos.

Especial agradecimiento a mi tutor de estancia realizada en el “Winter Sport Centre” de Östersund. Thank you very much for everything to **Hans-Christer Holmberg**, and also, thanks for your help to **Hampus, Lina, Maria, Matilda, Martina, Glenn, Kurt, Sture, Maggie...**(tack så mycket).

Agradecer la colaboración de todos los sujetos que participaron en los estudios, así como a La **Universidad de Las Palmas de Gran Canaria**, en especial al equipo del **Vicerrectorado de Investigación y al Departamento de Educación Física** por su fantástica gestión durante el doctorado. A su vez, a todo el personal de **Administración** y servicios de **Conserjería** de la Facultad de Educación Física.

Agradecer también a esta tierra canaria, la cual me ha enseñado su cultura y brindado su hospitalidad, que han hecho que me sintiera como en mi propia casa.



Agradecimiento especial a **mis amigos** de toda la vida (que no son pocos), ya que los valores que me acompañan de sacrificio, esfuerzo, honestidad y lucha se los debo en gran parte a ellos.

Muchísimas gracias por tu ayuda **Gema**. Has conseguido darme las fuerzas necesarias para seguir adelante en los momentos más difíciles, sin ti esto no hubiera sido posible. Nunca olvidaré tu comprensión y sacrificio a la hora de entender las horas que han sido necesarias para sacar adelante este trabajo, demostrándome cada día tu amor y apoyo ante este reto. El camino recorrido durante este tiempo ha sido difícil y duro, pero contigo ha pasado rápido al hacerlo todo más fácil y bonito. Por TODO, AL.

Y por último, quiero agradecer a **mi familia**, por la confianza y el apoyo incondicional demostrado siempre durante tantos años. En especial a **mis padres**, quienes desde la distancia me apoyan como si estuvieran aquí. Os doy las gracias por la motivación que me transmitís para intentar llegar a ser alguien; espero que parecido a vosotros. Gracias por haberme transmitido estos valores de los cuales me siento tan orgulloso.

Esta tesis va dedicada a vosotros.



## Lista de publicaciones originales

La presente tesis se basa en las siguientes publicaciones:

### Artículo I (Ara et al. 2010):

*Ara I, Larsen S, Stallknecht B, Guerra B, Morales-Alamo D, Andersen JL, Ponce-González JG, Guadalupe-Grau A, Galbo H, Calbet JA, Helge JW. (2010).*

Normal mitochondrial function and increased fat oxidation capacity in leg and arm muscles in obese humans. *Int J Obes (Lond)*.

- ✓ *Parte de estos resultados se presentaron en formato póster en el Congreso Internacional ECSS realizado en Antalya'2010, obteniendo el premio YIA, otorgados a investigadores jóvenes con mejores comunicaciones del congreso.*

### Artículo II (Ponce-González et al. 2011)

*Jesús Gustavo Ponce-González, Amelia Guadalupe-Grau, Francisco Germán Rodríguez-González, Cecilia Dorado, Hugo Olmedillas, Teresa Fuentes, Lorena Rodríguez-García, Bonifacio Nicolás Díaz-Chico, José A L Calbet. (2011).*

Androgen receptor gene polymorphisms and the fat-bone axis in young men and women. *J Androl. (In press)*.

### Artículo III (Ponce-González et al. 2011)

*Jesús Gustavo Ponce-González, Amelia Guadalupe-Grau, Francisco Germán Rodríguez-González, Cecilia Dorado, Rafael S. de Torres-Peralta, David Morales-Alamo, Lorena Rodríguez-García, Bonifacio Nicolás Díaz-Chico, José A L Calbet. (2011).*

Androgen receptor gene polymorphisms fat mass accumulation, and maximal fat oxidation capacity. A longitudinal study. *Int J Obes (Lond)*. *(En revisión)*



### **Fuentes de financiación**

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca del “Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario” (FPU), concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España.

Las investigaciones realizadas para conseguir las publicaciones que se recogen en esta tesis han sido financiadas por los siguientes proyectos de investigación:

Influencia del polimorfismo del receptor de andrógenos en la masa muscular, la morfología muscular y la respuesta hipertrófica al entrenamiento de fuerza. Financiado por Ministerio de Educación y Ciencia, DEP2006-56076-C06-04/ACTI (I.P.: Dra. Cecilia Dorado García).

Proyecto Estructurante de la ULPGC (ULPAPD-08/01-4). Integración de los grupos de investigación en Ciencias de la Salud entorno al estudio de la obesidad y el síndrome metabólico con un enfoque molecular, celular, fisiopatológico, epidemiológico y psicosocial (I.P.: Dr. Jorge Freixinet Guilart y Dr. José A L Calbet).

Mecanismos fisiológicos y moleculares de la reducción de masa grasa en seres humanos mediante ejercicios de musculación. Financiado por el Gobierno de Canarias PI042005/177 (I.P.: Dr. José A L Calbet).

PROYECTO DE INFRAESTRUCTURA 2008, UNLP08-3E-005 (Ayudas del programa nacional de infraestructuras científico-tecnológicas dentro del plan nacional de investigación científica, desarrollo e innovación tecnológica 2008-2011. Financiado por MICINN y FEDER. (I.P.: Dr. José A L Calbet).



## Abreviaturas

**ACC:** Acetil-CoA carboxilasa.

**ACSLs:** Long-chain acyl CoA synthetases.

**AG:** Ácidos grasos.

**AGCC:** Ácidos grasos de cadena corta.

**AGCL:** Ácidos grasos de cadena larga.

**AGCM:** Ácidos grasos de cadena media.

**AGL:** Ácidos grasos libres.

**AGRP:** Agouti Related Peptide.

**AGT:** Ácido graso-translocasa.

**AMPK:** Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato.

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

**AR-/y:** Ratones knockout para el receptor de andrógenos.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**CART:** Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript; péptidos anorexigénicos regulado por cocaína y anfetamina.

**CoA:** Coenzima A.

**CPTI:** Carnitin-palmitoil transferasa I.

**CPTII:** Carnitin-palmitoil transferasa II.

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

**ECNT:** Enfermedad crónica no transmisible.

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

**ERA:** Elementos de respuesta a andrógenos.

**FABP:** Fatty acid binding protein, proteína que une ácidos grasos.

**FABPPM:** Fatty acid binding protein of the plasma membrane.

**FAT:** Fatty acid translocase; proteína translocasa de AG.

**FatMax:** Intensidad a la que ocurre la oxidación máxima de grasas.

**FATP:** Proteína transportadora de AG.

**HCO:** Hidratos de carbono.

**IMC:** Índice de masa corporal.



- INE:** Instituto Nacional de Estadística.
- JAK:** (Janus Kinase), proteína quinasa Janus.
- Kcal:** Kilocalorías.
- LHS:** Lipasa hormono sensible.
- LPL:** Lipoproteína lipasa.
- MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés "Mitogen-Activated Protein Kinase".
- MFO:** Oxidación máxima de ácidos grasos, del inglés "Maximal fatty acid oxidation".
- Min:** Minuto.
- NEFA:** Non-esterified fatty acids.
- NPY:** Neuropeptido Y.
- OMS:** Organización mundial de la salud.
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- POMC:** (Proopiomelanocortin), proopiomelanocortina.
- PTAG:** Proteína transportadora de ácidos grasos.
- PUAG:** Proteínas de unión de AG.
- RER:** Ratio de intercambio respiratorio, del inglés. "Respiratory exchange ratio".
- RPM:** Revoluciones por minuto.
- RQ:** Cociente respiratorio, del inglés "Respiratory quotient".
- SD:** Desviación estándar, del inglés "*standard deviation*".
- SHBG:** Globulina transportadora de hormonas sexuales, del inglés "sex hormones binding globulin".
- SNC:** Sistema Nervioso Central.
- T:** Testosterona.
- TG:** Triglicéridos.
- TGIM:** Triglicéridos intramuscular.
- VCO<sub>2</sub>:** Consumo de dióxido de Carbono.
- VLDL:** Very low-density lipoprotein.
- VO<sub>2</sub>:** Consumo de oxígeno.
- VO<sub>2max</sub>:** Consumo máximo de oxígeno.
- W:** vatios.

**RESUMEN GENERAL**  
**(SUMMARY)**







## Resumen general

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación excesiva de grasa que aumenta el peso corporal y puede ser perjudicial para la salud. Actualmente, la obesidad constituye el principal problema de salud comunitaria al que deberá enfrentarse la sociedad occidental y especialmente la sociedad canaria en los próximos años. Además, es considerada como una de las alteraciones metabólicas de mayor repercusión en el ámbito psicológico, social y económico. A su vez, la acumulación excesiva de grasas puede originar diabetes, resistencia a la leptina, enfermedades cardiovasculares y alteraciones metabólicas.

El grado de acumulación de grasa puede variar entre personas con vidas similares. Las posibles causas son desconocidas hoy en día, aunque recientemente se ha relacionado la obesidad con problemas en la capacidad de oxidar grasas durante el ejercicio. A su vez, este hecho se ha relacionado con una disfunción de la actividad oxidativa mitocondrial y con la influencia de posibles variaciones genéticas, conocidas como polimorfismos.

Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis es dilucidar qué factores podrían estar afectando la acumulación y la oxidación de grasas. Con este fin, realizamos en primer lugar un estudio para comprobar si la disminución en la capacidad de oxidar grasas en personas obesas era explicada por una disfunción mitocondrial o por cambios en la actividad de la vía AMPK/ACC mediada por leptina. A su vez, también quisimos averiguar si esa disminución en la capacidad de oxidación de grasas se podría restaurarse tras un programa de pérdida de peso hasta una composición corporal semejante a los sujetos controles. Para ello, seleccionamos a 10 hombres obesos (O), 10 hombres post-obesos (PO) y 10 hombres sanos controles (C). La metodología llevada a cabo consistió en un test de calorimetría indirecta en cicloergómetro realizado tanto en piernas como en brazos. También se hicieron mediciones basales en el músculo vasto lateral y deltoides (muestra obtenida a través de biopsia muscular) de la fosforilación de AMPK y ACC, expresión proteica de SOCS3, actividad enzimática mitocondrial (CS, HAD y LHS) y del flujo de O<sub>2</sub> de la respiración mitocondrial. Los resultados demostraron que la capacidad máxima de oxidar grasas está aumentada en obesos y en post-obesos comparados con los sujetos controles durante el ejercicio



de piernas; y en obesos comparados con los controles, en el ejercicio realizado con los brazos. A su vez, la actividad enzimática y la respiración mitocondrial no estaban atenuadas en obesos y post-obesos. Por otro lado, la fosforilación de AMPK y la expresión proteica de SOCS3 fue similar en los tres grupos. Sin embargo, la fosforilación de ACC a nivel basal estaba disminuida en el vasto lateral de los obesos comparado con post-obesos y controles, pero aumentada en el deltoides comparado con controles. Estos resultados se dieron pese a que los tres grupos fueron ajustados por edad, tipo de fibras y  $VO_{2max}$ , demostrando que la capacidad de oxidar grasa no está disminuida en obesos, pudiendo estar afectada la acumulación de grasa por factores genéticos.

Uno de esos factores genéticos podría ser el polimorfismo del receptor de andrógenos. La testosterona facilita la lipólisis y disminuye la masa grasa actuando a través del receptor de andrógenos, el cual presenta variaciones polimórficas que afectan a la eficacia con la que los andrógenos son capaces de producir sus efectos en las células diana. Por ello, los polimorfismos CAG (poliglutamina) y GGN (poliglicina) del gen del receptor de andrógenos podrían determinar parte de los efectos de esta hormona sobre la adiposidad. Por lo tanto, el objetivo principal de los *estudio II* y *III* fue determinar la influencia del polimorfismo del receptor de andrógenos sobre la acumulación de grasa y la respuesta lipolítica al ejercicio.

El *estudio II* se realizó con 319 hombres y con 78 mujeres, a los que se les midió la composición corporal mediante DXA, la longitud del número de repeticiones del polimorfismo CAG y GGN a través de PCR y las hormonas de leptina, testosterona libre y osteocalcina a través de kits de ELISA. Los resultados demostraron que el polimorfismo CAG tiene poca o ninguna relación sobre la masa grasa y los niveles de leptina, testosterona libre y osteocalcina en hombres y mujeres jóvenes. Sin embargo, el polimorfismo GGN demuestra tener una asociación directa con el porcentaje de grasa ( $r=0.30$ ;  $p<0.05$ ), el porcentaje de grasa en el tronco ( $r=0.28$ ;  $p<0.05$ ), la concentración sérica de leptina ( $r=0.40$ ;  $p<0.05$ ) y con la concentración sérica de osteocalcina ( $r=0.32$ ;  $p<0.05$ ) en mujeres jóvenes, pero no en hombres.



Por otro lado, los niveles de testosterona libre en hombres se relacionaron inversamente con la adiposidad y con la concentración sérica de leptina, y positivamente con osteocalcina. Este hecho demuestra que existe un efecto importante de los andrógenos sobre la masa grasa en hombres, por lo que resulta raro no haber encontrado efectos del polimorfismo del receptor de andrógenos sobre el tejido adiposo en hombres. Por lo que nos plantemos realizar el *estudio III* con hombres que tuvieran polimorfismos extremos del receptor de andrógenos, pudiendo incrementar los posibles efectos.

El *estudio III* comenzó con la medición del polimorfismo CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos en 319 hombres. Una vez medido, se seleccionaron aquellos hombres que pertenecían al primer y cuarto cuartil del polimorfismo CAG y GGN del receptor de andrógenos. El metabolismo basal y la capacidad máxima de grasas se midieron mediante un test de calorimetría indirecta, mientras que las hormonas de leptina, testosterona libre y osteocalcina se midieron a través de kits de ELISA. A su vez, se realizó un estudio longitudinal (~7 años) con los mismos sujetos para la determinación de los cambios en la composición corporal mediante DXA. En concordancia con el *estudio II*, los resultados demuestran que el número de repeticiones polimórficas de CAG tienen poca o ninguna relación con la masa grasa, ya que los grupos con polimorfismos de repetición CAG cortos (CAG<sub>S</sub>) y largos (CAG<sub>L</sub>) tuvieron un metabolismo basal y una capacidad máxima de oxidación de grasas comparables, y acumularon cantidades similares de grasa durante el paso de los años. Sin embargo, aquellos sujetos pertenecientes al grupo con un GGN más largo (GGN<sub>L</sub>) tuvieron menos grasa corporal y troncal que los sujetos del grupo corto de GGN (GGN<sub>S</sub>). Además, el grupo GGN<sub>L</sub> obtuvo valores ligeramente superiores en la capacidad máxima de oxidación de grasas ( $p=0.06$ ), quienes además acumularon menos masa grasa, particularmente en el tronco, tras el paso de los años. Por otro lado, el  $VO_{2max}$  (por kg de masa magra de las piernas) pudo explicar un 53% de la varianza en la capacidad máxima de oxidación de grasa. Sin embargo, las diferencias encontradas entre los grupos de GGN no se pueden explicar por este factor, ya que tenían valores similares en  $VO_{2max}$ .

Por lo tanto, estos dos últimos estudios demuestran que el polimorfismo del receptor de andrógenos, más concretamente el GGN, influye en la acumulación



de grasa corporal tanto en hombres como en mujeres. Hemos constatado además, que existe un dimorfismo sexual en la influencia que tiene el polimorfismo del receptor de andrógenos en la acumulación de grasa corporal.



## Summary

Overweight and obesity are defined as an excessive accumulation of fat, which increases body weight and may be harmful to health. At present, obesity is the major community-health problem for Western society and, specially, in Canary Islands' for the next years. Furthermore, it has been considered as one of the greatest metabolic disorders, which affects the psychological, social and economic development. In turn, excessive accumulation of fat can lead to develop diabetes, leptin resistance, cardiovascular disease and metabolic disorders.

The degree of fat accumulation can vary among people with similar life style. Possible causes are unknown up to date, but recently the inability to oxidize fat during exercise has been linked to obesity. In turn, it seems to be associated to a dysfunction of mitochondrial activity and the possible influence of genetic variations, called polymorphisms.

Therefore, the main aim of this thesis was to determine which factors could be affecting accumulation and oxidation of fat in adults. To this purpose, we performed a study to test whether the ability to oxidize fat in obese individuals is decreased by a mitochondrial dysfunction or changes in the activity of AMPK/ACC pathway mediated by leptin. In turn, we also wanted to determine whether the decreased capacity to oxidize fat could be restored after a weight loss program. For this study, we selected 10 obese men (O), 10 postobese men (PO) and 10 healthy control men (C). Fat oxidation capacity was determined with indirect calorimetry during bicycling and arm cranking exercise. Baseline measurements were also performed on muscle biopsy samples obtained from the vastus lateralis and deltoid muscle to determine the phosphorylation of AMPK and ACC, SOCS3 protein expression, mitochondrial enzyme activity (CS, HAD and HSL) and the O<sub>2</sub> flux of mitochondrial respiration (chamber respirometry). The maximal capacity to oxidize fat was increased in obese and postobese compared with control subjects in the leg exercise; and in obese compared with control in the arm exercise. In turn, enzyme activities and mitochondrial respiration were not attenuated in obese and post-obese. On the other hand, AMPK phosphorylation and SOCS3 protein expression was similar in the three groups. However, ACC phosphorylation at baseline was decreased in the vastus lateralis of obese



compared with post-obese and control, but it was increased compared to control in the deltoid muscle. The three groups were matched for age, type of fiber and  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , and the ability to oxidize fat was not found reduced in obese humans.

Other factors, such as genetic factors, could contribute to explain the variability in fat mass. Androgen receptor (AR) CAGn (polyglutamine) and GGNn (polyglycine) repeat polymorphisms determine part of the androgenic effect and may influence adiposity. Therefore, the main aim of *study II* and *III* was to ascertain the influence of the androgen receptor polymorphism on the accumulation of fat mass and the lipolytic response to exercise.

*Study II* was performed with 319 men and 78 women. The length of CAG and GGN repeats was determined by PCR and fragment analysis, and confirmed by DNA sequencing of selected samples. Body composition was measured by DXA, and the serum concentrations of the hormones leptin, free testosterone and osteocalcin through ELISA kits. No association between AR polymorphisms and adiposity or the hormonal variables was observed in men. However, in women, GGN repeat number was linearly related to the percentage of body fat ( $r=0.30$ ,  $P<0.05$ ), the percentage of fat in the trunk ( $r=0.28$ ,  $P<0.05$ ), serum leptin concentration ( $r=0.40$ ,  $P<0.05$ ), and serum osteocalcin concentration ( $r=0.32$ ,  $P<0.05$ ). In men, free testosterone was inversely associated with adiposity and serum leptin concentration, and positively with osteocalcin, even after accounting for differences in CAG and GGN length or both. In summary, this study shows that the AR repeat polymorphism has little influence on the absolute and relative fat mass or its regional distribution in physically active men. In young women, the GGN length is positively associated with adiposity, leptin and osteocalcin. This study did not rule out a potential influence of AR repeat polymorphism on fat mass accumulation in men with extreme repeat length of the CAG and GGN AR. Thus, we considered this possibility in *study III*.

The *study III* began with the assessment of CAG and GGN repeat AR polymorphisms in 319 men. Once measured, we selected men who belonged to the first and fourth quartiles of CAG and GGN polymorphisms of the androgen receptor. The basal metabolic rate and the maximal fat oxidation capacity were



measured by indirect calorimetry, while the leptin, free testosterone and osteocalcin serum concentrations were determined using ELISA kits. A longitudinal assessment was performed using retrospective data (about seven years of follow up). In agreement with the *study II*, the number of polymorphic CAG repeats have little, if any, relation with fat mass, because the groups CAG<sub>L</sub> and CAG<sub>S</sub> had similar basal metabolic rate and maximal fat oxidation capacity and accumulated similar amounts of fat over years. However, the subjects who belonged to group with more GGN (GGN<sub>L</sub>) repeats showed less whole body fat and trunk fat than subjects with short GGN repeats. Moreover, the GGN<sub>L</sub> group also reached higher maximal fat oxidation capacity ( $p = 0.06$ ), and accumulated less body fat, particularly in the trunk region. The VO<sub>2max</sub> (per kg of lower extremity lean mass) could explain 53% of the variance in the maximal fat oxidation capacity. However, the differences between the GGN groups could not be explained by this factor, because both groups had similar values in VO<sub>2max</sub>.

Therefore, these two studies showed that androgen receptor polymorphism, specifically the GGN, has an important effect on fat mass. There is a sexual dimorphism in the GGN polymorphism influence on fat mass.





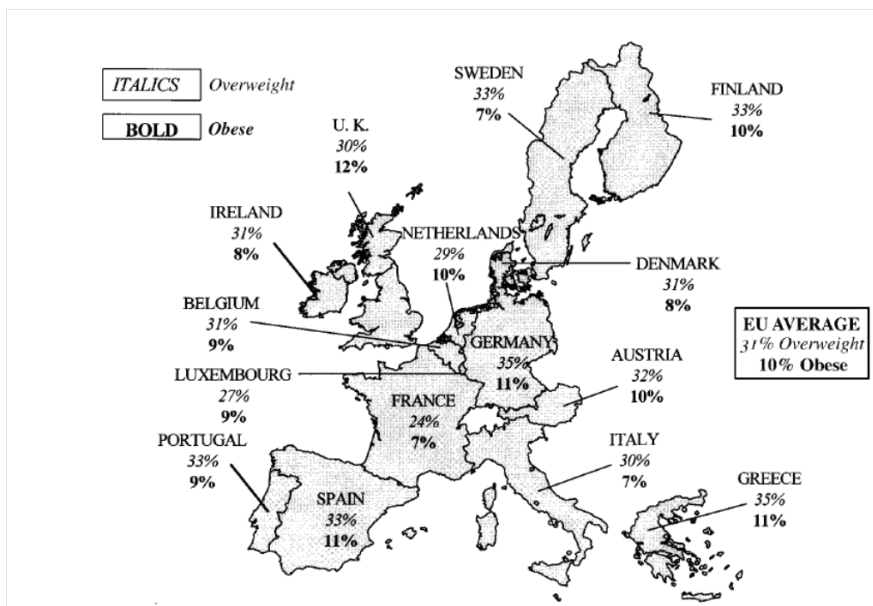
# **INTRODUCCIÓN**



### 1. Introducción

El incremento del sobrepeso y de la obesidad que se observa en el mundo en los últimos años, y muy especialmente en las sociedades desarrolladas, han conducido a que la obesidad represente en la actualidad un auténtico problema sanitario que ha sido considerado por la OMS, como la epidemia del siglo XXI.

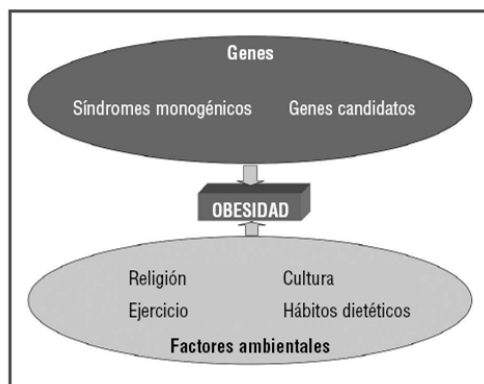
De hecho, un 66% de la población adulta en Estados Unidos presenta sobrepeso u obesidad (Ogden et al. 2006). En 1997, el *Institute of European Food Studies (IEFS)* promovió un estudio en los 15 estados de la Unión Europea para determinar geográficamente la prevalencia de obesidad (Figura 1). El Reino Unido mostró la mayor prevalencia de obesidad (12%), seguido de España (11%). A su vez, la mayor prevalencia combinada de obesidad y sobrepeso tuvo lugar en España, Alemania y Grecia (Martinez et al. 1999). Esos datos han ido en aumento en España hasta la actualidad, donde el 17,1% de las personas de más de 18 años presentan obesidad y el 36,7% sobrepeso (Encuesta europea de salud en España, INE, 2009).



**Figura 1.** Distribución geográfica de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en los 15 Estados Miembros de la Unión Europea (obtenido de J.A. Martínez (Martinez et al. 1999)).

La forma más efectiva para lograr un menor acumulación de grasa es instaurar un balance energético negativo de forma que el gasto calórico sobrepase a la ingesta (Bray 1987). Por lo tanto, es muy importante la práctica regular de actividad física; la cual además se relaciona con un menor riesgo cardiovascular y por lo tanto con una menor mortalidad de la población general (Ara et al. 2004; Blair and Jackson 2001; Borodulin et al. 2005; Hu et al. 2004).

Sin embargo, la obesidad es una enfermedad multifactorial. Se estima que entre el 40-70% de la variación en los fenotipos relacionados con la obesidad es de carácter genético (Comuzzie and Allison 1998; McCaffery et al. 2011), mientras que las influencias externas como la actividad física y el factor ambiental podría explicar cerca del 30% de los casos de obesidad (Hill 1998). Actualmente, se considera que la causa mayoritaria de la obesidad es la interacción ambiental en individuos con haplotipos de genes susceptibles o candidatos de obesidad (Bell et al. 2005). Por tanto, es muy probable que no exista un solo tipo de obesidad, sino varios genotipos con fenotipos similares (Figura 2).



**Figura 2.** Etiología de la obesidad (obtenido de A.G. Hernández et al (2007). Genética de la obesidad humana. *Nutrición Clínica en Medicina* Vol.1, nº3, pp 163-173).

Entre los genes implicados en la etiología de la obesidad se encuentran genes que codifican péptidos de función que regulan el apetito y la saciedad, genes implicados en el crecimiento y diferenciación de los adipocitos, genes metabólicos y genes implicados en el control del gasto energético (Rankinen et al. 2006).



### 1.1. Ácidos grasos

Los hidratos de carbono y las grasas constituyen las dos fuentes principales de energía para la resíntesis de ATP en la contracción muscular. Aunque los aminoácidos de cadena ramificada, así como otros aminoácidos, pueden ser oxidados en el músculo, se piensa que su contribución al gasto total de energía es insignificante durante el ejercicio.

Los lípidos almacenados en el organismo constituyen la principal reserva energética. La mayoría de los lípidos poseen una estructura construida a partir de ácidos grasos (AG). Los AG se pueden encontrar de forma libre (AGL) por el organismo, pero en muy pequeña cantidad. Aunque se use el término de AGL, realmente estos AG están unidos a la albúmina y no se encuentran “libres”. Sólo una pequeña fracción de AG se encuentran realmente libres (< del 0.01% del “pool” de ácidos grasos en plasma) y no unido a ningún otro compuesto (ácidos grasos no unidos a proteínas) (Glatz and van der Vusse 1988; Richieri et al. 1993; Richieri and Kleinfeld 1995).

Los ácidos grasos que se encuentran en humanos con una longitud de cadena de C8 o C10 son llamados ácidos grasos de cadena media (AGCM) mientras que aquellos con una longitud de cadena de C6 o menos son llamados ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Hornstra 1982). Sin embargo, los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) con una longitud de cadena de C12 o más son los más abundantes en el organismo; como son los ácidos palmítico (C16) y oleico (C18, con un enlace doble).

Los lípidos utilizables en el metabolismo y que por tanto se pueden oxidar incluyen ácidos grasos, triacilglicéridos intramusculares (TGIM) y triacilglicéridos circulantes en plasma, los cuales son comúnmente incorporados en las lipoproteínas como quilomicrones (AG absorbidos en el intestino delgado por la dieta recubierto de una capa proteica). Por otro lado, las lipoproteínas sintetizadas por el hígado suponen la otra fuente de TG para el tejido adiposo y muscular, encontrándonos con las lipoproteínas de baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las densidades, contenido de TG y de colesterol de estas lipoproteínas difieren entre ellas,



pero también tienen funciones diferentes. El VLDL, por ejemplo, es la especie principal de lipoproteínas que transportan la mayor cantidad de AG en forma de TG transportándolos desde el hígado hacia el tejido adiposo y el músculo, mientras que la función del HDL, es el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado. Por lo tanto, los quilomicrones y el VLDL se encargan de transportar los AG al tejido adiposo y muscular, y a través de la lipoproteína lipasa (LPL), que hidroliza los complejos lipoproteicos a TG y glicerol, que luego son captados por los adipocitos o miocitos (Braun and Severson 1992). A su vez, los quilomicrones y el VLDL pueden desempeñar un pequeño rol en el metabolismo energético durante el ejercicio, ya que el ejercicio intenso y prolongado produce un descenso en las concentraciones plasmáticas de estas dos lipoproteínas (Hashimoto et al. 2011; Sondergaard et al. 2011; Terjung et al. 1982). Sin embargo, con el ejercicio de moderada intensidad, las concentraciones de estas lipoproteínas no se ven alteradas. Por otro lado, la IDL y HDL probablemente no desempeñen un rol significativo en la provisión de energía para el músculo.

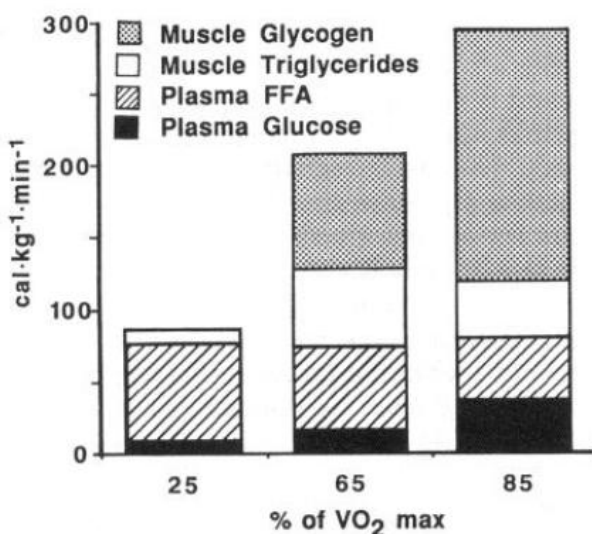
### ***1.1.1. Oxidación de ácidos grasos durante el ejercicio***

Los únicos lípidos que parecen contribuir de forma significativa al metabolismo energético son los AG libres (AGL) (Oscari and Palmer 1988; Romijn et al. 1995), que aunque presentan concentraciones micromolares son la mayor fuente lipídica de combustible circulante (Jensen 2003). Los AGL pueden aumentar de dos a cuatro veces con el ejercicio de intensidad moderada. Sin embargo, la mayoría de los ácidos grasos se encuentran en forma de triglicéridos intramusculares (TGIM) ( $\sim 7\text{-}40 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (Brouns et al. 1989; Essen 1977; Froberg et al. 1975; Hurley et al. 1986), TG plasmáticos ( $\sim 1/5$  del depósito disponible de AGL) y en forma de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) (Jensen 2003; Oscari and Palmer 1988; Romijn et al. 1995). Además, se ha demostrado que las fibras musculares de tipo I tienen un contenido de TG más alto que las de tipo II (Essen 1977; Froberg 1971), debido a que los AG se oxidan principalmente en las fibras de tipo I, las cuales se activan durante los ejercicios de baja y moderada intensidad.

Se ha estimado que aproximadamente la mitad de los AG oxidados en el músculo durante el ejercicio proviene de los AG circulantes (VLDL, quilomicro-



nes, AGL), mientras que el otro 50% proviene de los TGIM (Hagenfeldt and Wahren 1968; Havel et al. 1967). Estudios realizados con biopsias musculares observaron como el contenido de TGIM disminuyó después del ejercicio (Brouns et al. 1989; Essen-Gustavsson and Tesch 1990; Froberg 1971; Reitman et al. 1973), en concordancia con el estudio realizado por Romijn y col. donde la contribución de los TG intramuscular fue del 7 %, 26 % y 8 % durante el ejercicio al 25, 65 y 85 %  $VO_2$ max, respectivamente (Figura 3) (Romijn et al. 1993).



**Figura 3.** Utilización de sustratos a diferentes intensidades de ejercicio después de 30 minutos de ejercicio (25 %  $VO_2$ máx, 65 %  $VO_2$ máx y 85 %  $VO_2$ máx). La cantidad de calorías totales disponibles en plasma no cambió eb relación con la intensidad al ejercicio. Gráfica obtenida de Romijn y col. (Romijn et al. 1993).

Las reservas de TG son unas 50 veces superiores a las reservas de hidratos de carbono (HCO). Representan un 90 % de la masa del tejido adiposo y alrededor de un 15 % del peso corporal en varones sedentarios (López Calbet y col. 1996), es decir de 90.000 a 100.000 kcal, dependiendo del grado de obesidad. A su vez, los AG proveen más ATP por molécula que la glucosa (147 ATP para el ácido esteárico por 38 ATP de la glucosa), y en parte es debido a que las grasas contienen más del doble de energía por gramo que los CHO (9 y 4 kcal/gr respectiva-



mente) (Frayn 1983). Sin embargo, para producir la misma cantidad de ATP, la oxidación de AG requiere más cantidad de oxígeno (McGilvery 1975).

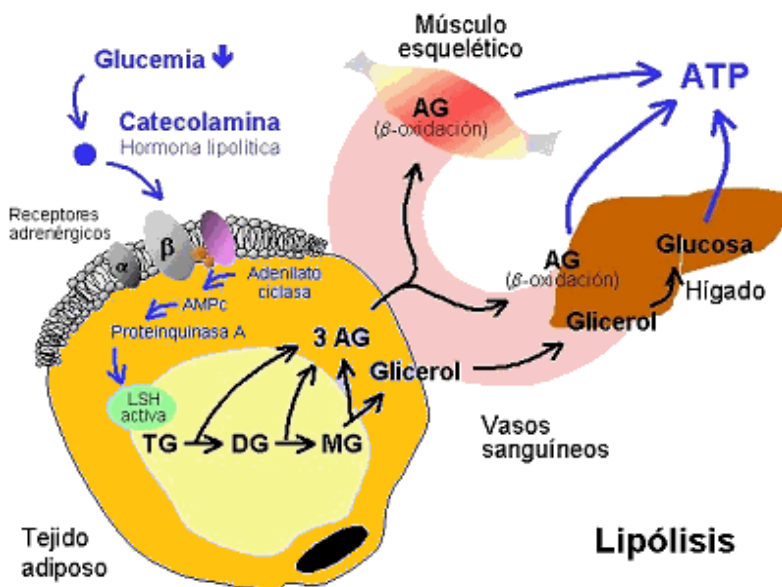
Durante el ejercicio, la lipólisis (utilización de las grasas) está activada constantemente, con una participación mayor al comienzo del ejercicio, aumentando la concentración plasmática de AGL hasta 20 veces (Havel et al. 1967), ya que se producen varios estímulos que promueven la lipólisis. Los principales estímulos son la actividad simpaticoadrenal, con un aumento de las catecolaminas en sangre, y el descenso de la concentración sanguínea de insulina. Estos estímulos provocan la activación de la enzima lipasa hormono sensible (LHS) (Froberg et al. 1975; Galster et al. 1981; Hales et al. 1978), que cataliza la reacción de triglicéridos a diacilglicéridos y monoglicéridos, liberándose al torrente sanguíneo AG y glicerol. Este último puede usarse como sustrato gluconeogénico en el hígado, o entrar en la célula muscular para incorporarse en la glucólisis anaeróbica (Robinson and Newsholme 1967) (Figura 4).

Las catecolaminas tienen un doble efecto sobre la velocidad de la lipólisis en el tejido adiposo actuando sobre los receptores adrenérgicos, el efecto alfa-adrenérgico inhibitorio, y el efecto beta-adrenérgico estimulante (Coppack et al. 1994; Fain and Garcija-Sainz 1983). La sensibilidad de los receptores beta-adrenérgicos aumenta con el ejercicio, favoreciendo la lipólisis (Wahrenberg et al. 1987). A través de estos receptores adrenérgicos se produce una activación de la adenilato ciclasa que actúa como enzima en la formación de AMPc a partir de ATP. El AMPc estimula la proteinquinasa, la cual activa mediante fosforilación a la LHS (Figura 4). Sin embargo, la insulina estimula las fosfodiesterasas que se encargan de disminuir el nivel de AMPc, desfosforilando a LHS e inhibiéndola.

La velocidad de la lipólisis depende entre otros factores de la capacidad de la sangre de transportar AG a través de la proteína transportadora albúmina (esta unión es lo que se conoce como AGL). El complejo AG-albúmina es necesario para hacerlos solubles en la sangre y para transportarlos hasta el músculo (Bulow et al. 1985). La concentración de albúmina en plasma suele ser bastante constante (~6mmol/l), mientras que la concentración de AG varía entre 0.2 y 1.0 mmol/l (excepto en ayuno prolongado y ejercicio de resistencia de larga duración). Otro



factor es el incremento del flujo sanguíneo al tejido adiposo que ocurre con el ejercicio, el cual también favorece la movilización de los AG aumentando la tasa de lipólisis (Bulow et al. 1985).



**Figura 4.** Control de la lipólisis en el adipocito humano a través de los receptores adrenérgicos. Imagen modificada del Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

En realidad, la mayor parte de los AG liberados durante el proceso de la lipólisis son esterificados nuevamente más que oxidados (Wolfe et al. 1990). Esta reesterificación puede ocurrir incluso antes de que el AG abandone el citoplasma del adipocito (intracelular), o bien, los AG pueden ser liberados y reesterificados en otros órganos como, por ejemplo, el hígado (reesterificación extracelular). El funcionamiento de este ciclo está regulado por hormonas (Miyoshi et al. 1988) y por sustratos (Wolfe and Peters 1987) siendo estimulado por el ejercicio.



El porcentaje de reesterificación de los AG en reposo es del ~70% de todos los AG liberados en la lipólisis (Wolfe et al. 1990). Durante los primeros 30 minutos del ejercicio moderado (40%  $VO_{2max}$ ) el porcentaje de reesterificación disminuye a un 25 % (reesterificación casi exclusivamente intracelular), mientras que la liberación de AG por la hidrólisis de TG es triplicada (Wolfe et al. 1990). Hodgetts y col. (1991) obtuvieron valores similares al realizar el ejercicio al 50-70% del  $VO_{2max}$ . Con el ejercicio submáximo la lipólisis se activa completamente y la reesterificación se inhibe, incrementando los AGL progresivamente con la intensidad del ejercicio (Gollnick et al. 1969; Wolfe et al. 1990). Esta respuesta permite incrementar el suministro de AGL a los tejidos mayormente consumidores de los mismos durante el ejercicio, es decir al hígado, al músculo esquelético y al corazón. Pero, inmediatamente después del ejercicio, el porcentaje de reesterificación aumenta hasta el 90 % (esta reesterificación sucede tanto a nivel intra como extracelular). Estos cambios en el porcentaje de reesterificación, permiten una respuesta metabólica rápida a las necesidades energéticas durante el ejercicio y la recuperación (Wolfe et al. 1990).

Sin embargo, a altas intensidades de ejercicio (>80%  $VO_{2max}$ ) disminuye la concentración de AGL liberados en plasma por parte del tejido adiposo (Romijn et al. 1993). Aunque recientemente se ha demostrado que la oxidación de grasa se activa en el proceso de recuperación tras un ejercicio de alta intensidad como es un test de Wingate (Guerra et al. 2010). Esto puede ser debido a que los niveles de AG en sangre son incrementados tras el ejercicio por el efecto de la activación metabólica, pudiendo llegar a un pico de concentración de AG durante el periodo de recuperación (~2 mmol/l) para después ir disminuyendo hasta valores basales (Jansson 1980). La oxidación de AG depende en gran parte de la concentración de AG en plasma (Hagenfeldt 1979).

Los AGL antes de pasar al interior celular requieren ser separados de la albúmina debido a que la pared de los capilares musculares tienen muy poca permeabilidad para el complejo AG-albúmina (Bassingthwaight et al. 1989). El proceso por el cual los ácidos grasos pueden difundir al interior celular parece estar mediado por alguna proteína transportadora de AG (FATP, FABP<sub>PM</sub>)(Brinkmann et al. 2002; Calles-Escandon et al. 1996; Glatz and van der



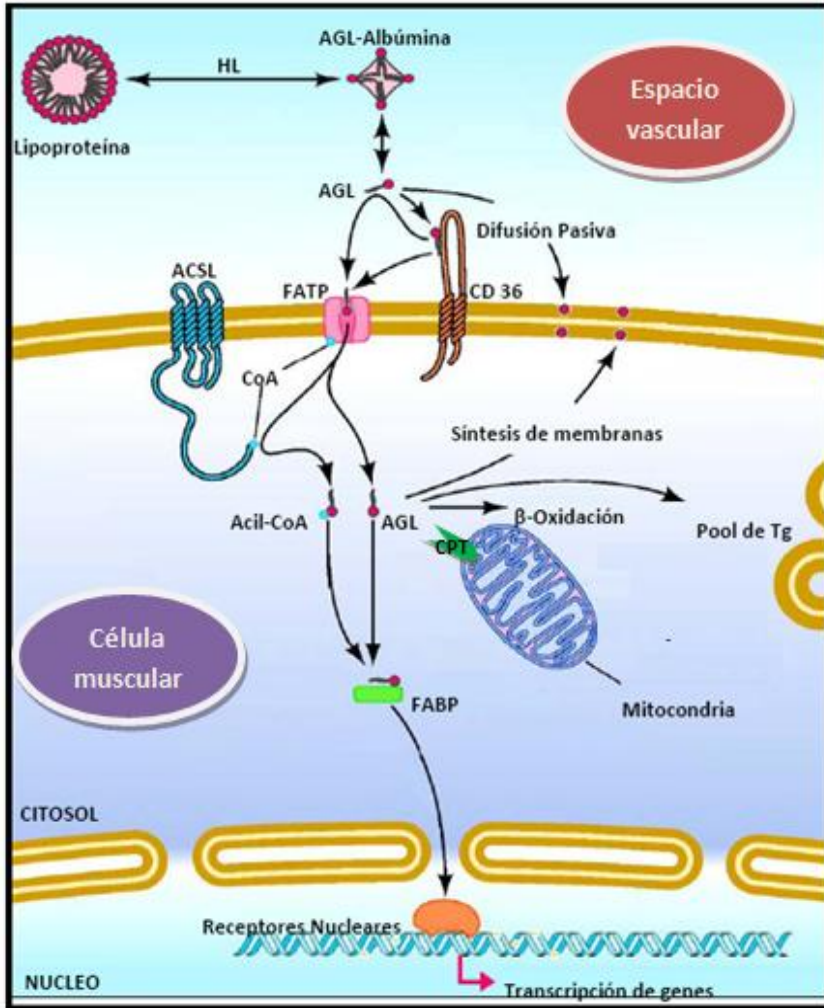
Vusse 1989), o una translocasa (FAT) como la CD36 (Abumrad et al. 1999) o una combinación de ambos (McArthur et al. 1999; Nguyen et al. 2008; Potter et al. 1989; Sampath and Ntambi 2005) (Figura 5). Se ha demostrado que las proteínas FATPs se encuentran en las membranas celulares y que su función principal es el transporte de AG a través de la membrana celular (Doege et al. 2006; Jump and Clarke 1999). Este traspaso de AG al interior de la célula muscular está regulado, impidiendo que capte más AG de los que necesita. Por otro lado, el aumento de AGL en el torrente sanguíneo con el ejercicio prolongado parece inducir un aumento en el contenido de TGIM en los músculos no ejercitados (Schrauwen-Hinderling et al. 2003).

Independientemente de la procedencia de los AG, una vez en el interior de la célula muscular, previamente a ser oxidados, los AG sufren un proceso de activación con el que aumentan su nivel energético. Esto se consigue mediante la unión de un coenzima A (CoA) al AG, formando el complejo acil-CoA (Figura 5). Si no fuera necesario oxidar el complejo acil-CoA; éste podría reestirificarse y almacenarse en forma de TGIM (Dagenais et al. 1976). El proceso de formación de acil-CoA requiere una molécula de ATP, desprendiéndose AMP.

Posteriormente, el acil-CoA se une a una proteína citosólica (proteína que une ácidos grasos -FABP-) que facilita su solubilización y posibilita su transporte a los diferentes compartimentos celulares (Calles-Escandon et al. 1996; Coe and Bernlohr 1998).

El acil-CoA es transportado a la matriz mitocondrial a través de carnitín-palmitoil transferasa I (CPTI), una translocasa y carnitín-palmitoil transferasa II (CPTII). El transporte dentro de la mitocondria es carnitina-dependiente, ya que en la membrana externa de la mitocondria convierte el complejo de acil-CoA en acil-carnitina a través de CPTI. Mientras que en la membrana interna, el complejo acil-carnitina vuelve a transformarse en acil-CoA por la CPTII. Por lo que las acil-carnitín transferasas y la carnitina permiten el paso de grupo radical acil y sin perder su valor energético. Este mecanismo de transporte de la membrana mitocondrial no depende del oxígeno, pero sí de la masa mitocondrial, ya que la concentración de acil-carnitín transferasas será mayor cuanto más número y tamaño

de mitocondrias se posea. Por este motivo, los AG son oxidados principalmente en las fibras tipo I, que son las que tienen más mitocondrias. Aunque en los sujetos entrenados las fibras tipo IIa pueden tener una densidad mitocondrial similar a la observada en las fibras tipo I.



**Figura 5.** Representación del proceso de captación de AG del torrente sanguíneo por parte de la célula muscular y su transporte hasta su oxidación en la mitocondria o su reestificación a TGIM. Figura modificada del artículo de Holger Doege and Andreas Stahl del año 2006 (Doege and Stahl 2006).



Las acil-carnitin transferasas son inhibidas por malonil-CoA, un intermediario de la biosíntesis de AG y que se forma a través de la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Cuando un estímulo aumenta la oxidación de AG, la ACC se fosforila inhibiéndose, disminuyendo la concentración de malonil-CoA, y por tanto permitiendo la captación de AG por parte de la mitocondria a través de la CPT (Guerra et al. 2010). Cuando las concentraciones de glucosa e insulina están aumentadas, se produce un aumento de la actividad de la ACC, y por tanto un aumento de la formación de malonil-CoA (Duan and Winder 1992; Guerra et al. 2010; Saha et al. 1995; Saha et al. 1997).

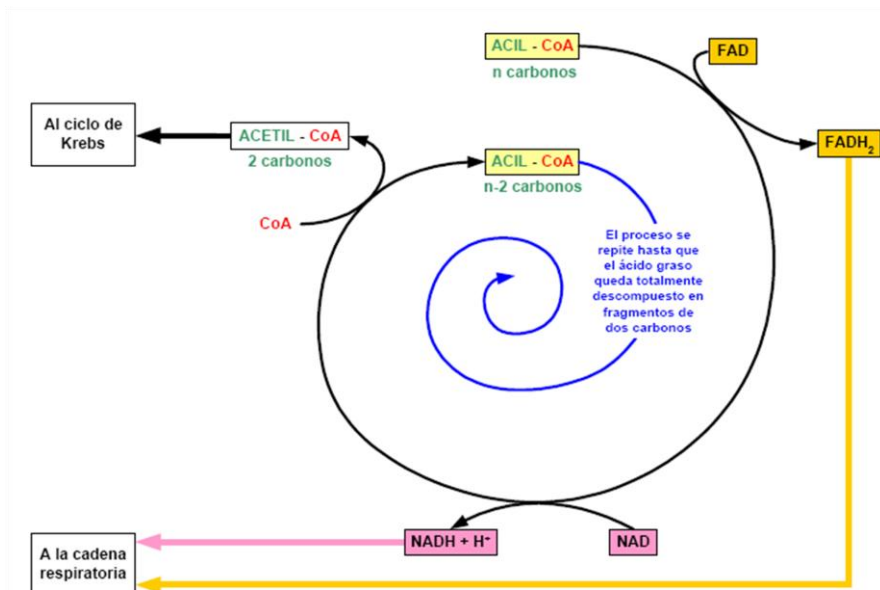
Una vez dentro de la mitocondria, los acil-CoA están preparados para entrar en el proceso de la oxidación mitocondrial.

### ***1.1.2. Oxidación mitocondrial***

La  $\beta$ -oxidación es un proceso metabólico donde se oxida el radical acilo en el carbono  $\beta$ , que es el que se encuentra en segunda posición, dando de nuevo un acil-CoA (acortado en dos átomos de carbono) más un acetil-CoA. Este proceso consta de cuatro reacciones enzimáticas, convirtiéndose en un proceso cíclico hasta que el acil-CoA que entró en la mitocondria quede dividido en fragmentos de dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA (Figura 6).

En el transcurso de la  $\beta$ -oxidación, se produce la extracción de átomos de hidrógeno unido a sus electrones, de manera que en cada  $\beta$ -oxidación se reduce un NAD y un FAD, transformándose en  $\text{NADH}+\text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$  respectivamente (Figura 6).

A continuación, el acetil-CoA producido entra en el proceso de ciclo de Krebs, de la misma manera que el procedente del piruvato. A partir de este momento el metabolismo oxidativo es común con el de los HCO. Los hidrógenos obtenidos de la  $\beta$ -oxidación y también en el ciclo de Krebs en forma de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$  terminarán unidos al oxígeno para forma  $\text{H}_2\text{O}$  y la energía liberada en este proceso se empleará para sintetizar ATP.



**Figura 6.** Representación de la fase de oxidación mitocondrial de AG,  $\beta$ -oxidación. Imagen obtenida de *Recursos de Biología y Geología* ([www.bioygeo.info](http://www.bioygeo.info)). © manuelgvs 2007.

La fosforilación oxidativa es el último paso para la obtención de energía e forma de ATP. También transcurre en el interior de la mitocondria y consta de dos procesos:

- 1.- Un proceso de oxidación espontáneo, exergónico, en el cual el oxígeno es el aceptor final de los electrones que se liberan de los átomos de hidrógeno.
- 2.- Un proceso de fosforilación, por el cual se incorpora un grupo fosfato al ADP para resintetizar el ATP. A diferencia del primer proceso, este es un proceso endergónico que para poder llevarse a cabo utiliza la energía liberada en la oxidación.

La cadena respiratoria consiste en una cadena de enzimas, coenzimas y citocromos en la cual cada componente representa un nivel de oxido-reducción. La

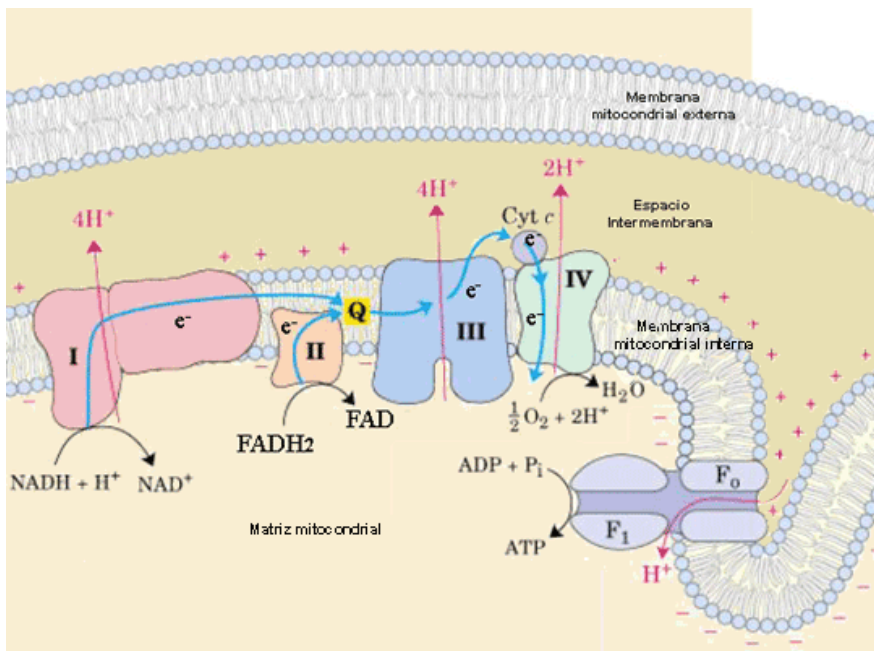


cadena o transporte de los electrones se realiza en la membrana interna de la mitocondria y gracias a ella se lleva a cabo el proceso de oxidación, donde los hidrógenos transportados en forma de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$  son descompuestos en  $\text{H}^+$  y en un  $\text{e}^-$ . Estos electrones van pasando por cada compuesto de la cadena respiratoria, y a medida que va pasando de un compuesto a otro se libera energía, que sirve para refosforilar el ADP. Finalmente, el oxígeno molecular obtenido del aire atmosférico acepta los electrones, transformándose en oxígeno iónico, el cual se une al  $\text{H}^+$  para formar  $\text{H}_2\text{O}$  (Figura 7).

La fosforilación oxidativa está acoplada a la cadena respiratoria, porque al transferir electrones se crea un gradiente importante que permite a la ATPasa mitocondrial generar ATP.

A continuación se desglosan todos los pasos de la fosforilación oxidativa por niveles (Figura 7).

- **Primer nivel:** El NADH llega a las crestas mitocondriales, donde se oxida con una "flavoproteína", reduciéndola (o sea cargándola de electrones).
- **Segundo nivel:** Posteriormente la flavoproteína se oxida y reduce a una coenzima denominada "Q". Durante este proceso se libera energía que ejecuta una primera fosforilación oxidativa de ATP.
- **Tercer nivel:** Es en este nivel donde ingresa el FADH. La coenzima Q que se encuentra reducida, se oxida reduciendo así a un compuesto denominado citocromo *b*. Durante esta oxidación se libera energía para ejecutar la segunda fosforilación oxidativa de ATP.
- **Cuarto nivel:** El citocromo *b* se oxida, reduciendo así al citocromo *c*.
- **Quinto nivel:** El citocromo *c* se oxida, reduciendo así al citocromo *a*.
- **Sexto nivel:** El citocromo *a* se oxida con oxígeno, reduciéndolo de esta forma a agua. Durante esta última oxidación se libera la energía para ejecutar la tercera y última fosforilación oxidativa de ATP.



**Figura 7.** Representación de la fase de fosforilación oxidativa que ocurre en la mitocondria, donde se obtiene finalmente la energía en forma de ATP tras el ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación.

La metodología actual para medir la función mitocondrial es evaluar en fibras musculares permeabilizadas con saponina como responde el flujo de oxígeno tras añadir diferentes sustratos e inhibidores. Esta técnica nos permite conocer la capacidad de la mitocondria en los diferentes pasos de la cadena respiratoria (Kuznetsov et al. 2008). Por otro lado, se utiliza como un índice de densidad y actividad mitocondrial la actividad de la enzima citrato sintetasa (CS), la cual cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs (Larsen et al. 2009; Stisen et al. 2006). En cuanto a analizar la activación de la  $\beta$ -oxidación de AG dentro de la mitocondria se analiza la actividad de la enzima  $\beta$ -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HAD)(Larsen et al. 2009; Stisen et al. 2006), la cual es muy importante, ya que es la encargada de reducir NAD a  $\text{NADH} + \text{H}^+$  en la reacción del paso perteneciente a la  $\beta$ -oxidación de hidroxiacil-CoA dando como producto  $\beta$ -cetoacil-CoA. Y a su vez, para evaluar la tasa de lipólisis se suele analizar por la actividad





de la lipasa hormono sensible (LHS) (Lampidonis et al. 2011; Stisen et al. 2006), ya descrita anteriormente.

### ***1.1.3. Factores determinantes de la oxidación de grasas***

Aunque los depósitos de grasas son relativamente grandes, la capacidad para oxidar ácidos grasos es limitada, y en muchos casos los carbohidratos son el sustrato predominantemente oxidado. Las limitaciones en oxidación de ácidos grasos podrían estar ubicadas a diferentes niveles:

1. Movilización de los ácidos grasos desde el tejido adiposo.
2. El transporte de ácidos grasos hacia el músculo.
3. El consumo de ácidos grasos por parte de la célula muscular.
  - a- El consumo de ácidos grasos plasmáticos.
  - b- El consumo de ácidos grasos desde la unión lipoproteína-TG circulante en plasma.
4. Movilización de ácidos grasos de los “pools” de TGIM.
5. El transporte de ácidos grasos dentro de la mitocondria.
6. La oxidación de ácidos grasos en la mitocondria.

Los principales factores externos que contribuyen en el metabolismo oxidativo de las grasas son la intensidad y duración del esfuerzo, así como del tipo de ejercicio, de la dieta habitual y del nivel de entrenamiento.

Se ha demostrado que la oxidación de AGL durante el ejercicio correlaciona con la concentración plasmática de AGL (Hagenfeldt and Wahren 1968; Issekutz et al. 1967), que depende de la intensidad y de la duración del esfuerzo. La concentración plasmática de AGL aumenta con la intensidad del esfuerzo, siempre y cuando ésta se mantenga por debajo de la intensidad a partir de la cual se acumula lactato (Paul 1970; Pruett 1970). En efecto, hasta intensidades de esfuerzo cercanas al 60-70 % del  $VO_2\text{max}$  la oxidación de AG aumenta con la intensidad y la duración del esfuerzo (Romijn et al. 1993). A intensidades de esfuerzo más elevadas (~85 % del  $VO_2\text{max}$ ), la concentración plasmática de AGL es similar a la de reposo y tiende a disminuir con la duración del esfuerzo, debido a que la res-



puesta hormonal que acompaña a este tipo de esfuerzo inhibe la lipólisis (Romijn et al. 1993).

Los ejercicios de poca duración pero con alta intensidad, como son los sprints, utilizan como fuente de energía predominante los HCO (Howlett et al. 1999; McKenna et al. 1997; Trump et al. 1996). Sin embargo, inmediatamente después de un sprint de 30 segundos se activan los mecanismos de oxidación de grasa y se mantienen activados hasta 30 minutos de la fase de recuperación (Guerra et al. 2010). A medida que la duración del ejercicio aumenta, la intensidad tiene que disminuir por falta de aporte energético tan rápido, y se van oxidando más AG.

El tipo de ejercicio también influye directamente en el ratio de oxidación de grasas. Achten y col. (2003) mostraron como la oxidación de grasa era mayor durante un ejercicio de carrera en tapiz rodante comparado con el realizado en cicloergómetro, a pesar de que se realizaron en el mismo rango de intensidad. Por ello, el tipo de ejercicio que se haga influye en la tasa de oxidación de AG, aunque se haga a una misma intensidad.

Por otro lado, la dieta es considerada como un factor adicional que repercute en la oxidación de grasas durante el ejercicio. Desde hace mucho tiempo, se conoce que la oxidación de grasas está incrementada durante el ejercicio tras el consumo de una dieta rica en grasas durante un plazo corto de tiempo (Krogh and Lindhard 1920). Resultados similares se han encontrado más recientemente en estudios que investigaron la oxidación de grasas durante el ejercicio tras una adaptación larga (mayor a 7 días) a una dieta rica en grasas (Phinney et al. 1983) (Helge et al. 1996; Schrauwen et al. 2000). Las dietas altas en grasas incrementan el ratio de NEFA (non-esterified fatty acids) disponible en plasma (Mittendorfer and Sidossis 2001; Phinney et al. 1983), la oxidación de grasas a nivel basal (Mittendorfer and Sidossis 2001), y disminuye las reservas de glucógeno hepático y muscular durante el ejercicio (Mittendorfer and Klein 2003; Phinney et al. 1983). Sin embargo, a pesar de ese aumento de NEFA disponibles en plasma, Schrauwen y col. (2000) encontraron que las grasas oxidadas provenientes del NEFA disponibles en plasma, no difieren entre una dieta alta en HCO y una alta



en grasas. Por lo tanto, el aumento en la oxidación de grasas durante el ejercicio que ocurre tras una dieta alta en grasas debe provenir de los TGIM o TG plasmáticos. Este hecho, se relaciona con el incremento de la actividad de la LPL que ocurre también como adaptación a una dieta rica en grasas, lo cual conlleva una mayor captación de TG plasmáticos por parte del músculo (Helge and Kiens 1997; Kiens et al. 1987). A su vez, este tipo de dietas ayuda a aumentar los TGIM (Kiens et al. 1987) (Helge et al. 1998), mientras que las dietas altas en HCO aumentan el glucógeno muscular (Helge et al. 2001).

Además, se ha demostrado que el índice glucémico producido con un simple desayuno alto en HCO afecta a la cantidad de grasa oxidada durante un ejercicio (1h al 65% del  $VO_2$ max) realizado tres horas después (Stevenson et al. 2009; Stevenson et al. 2006). El grupo que tomó un desayuno bajo en HCO obtuvo una oxidación de grasas ~55% mayor que el grupo que tomó el desayuno rico en HCO, pudiendo ser explicado por el correspondiente aumento de insulina en sangre, la cual tiene un efecto inhibitorio de la lipólisis como ya comentamos previamente. Incluso una ingesta de HCO una hora antes de realizar ejercicio inhibió la lipólisis durante el ejercicio (Hargreaves et al. 2004). Sin embargo, tanto el grupo que tomó HCO una hora antes de realizar ejercicio, como el grupo control (en ayunas), la oxidación de grasa fue activada por igual en el proceso de recuperación tras un Wingate mediante la fosforilación de ACC (Guerra et al. 2010).

La capacidad de oxidar grasas provenientes del NEFA y VLDL-TG plasmáticos tras 7 semanas de entrenamientos fue mayor en los sujetos que tomaron una dieta alta en grasas comparados con el grupo que tomó una dieta alta en HCO (Helge et al. 2001). En concordancia, un estudio publicado recientemente, demuestra que el entrenamientos de resistencia (6 semanas) realizado en ayunas mejora la capacidad de oxidación de grasas, aumenta la actividad mitocondrial (CS y HAD) y el uso de TGIM comparados con el mismo entrenamiento efectuado tras un desayuno, en sujetos que durante las 6 semanas ingirieron la misma cantidad de calorías (Van Proeyen et al. 2011).



Con el entrenamiento de resistencia aumenta la habilidad para oxidar AG en lugar de HCO, con lo que se retrasa el agotamiento de las reservas hepáticas y musculares de glucógeno. El ahorro de glúcidos contribuye a retrasar la aparición de la fatiga (Coggan et al. 1995). Se ha sugerido que el descenso en la producción de ATP durante el ejercicio prolongado, observado cuando se produce el agotamiento de las reservas musculares de glucógeno, es debido a una disminución de la velocidad de suministro de unidades de acetil-CoA al ciclo de Krebs y/o a un descenso de la concentración de compuestos intermedios del mismo (Broberg and Sahlin 1989; Fitts 1994). No obstante, el suministro de unidades de acetil-CoA al aparato mitocondrial no limita la actividad del ciclo de Krebs, ya que la relación acetilcarnitina/carnitina se mantiene en dichas condiciones (Sahlin et al. 1990).

Tal y como señalábamos anteriormente, el entrenamiento de resistencia produce cambios en el metabolismo que permiten aumentar la fracción de ATP resintetizado a partir de la oxidación de AG, con el consiguiente ahorro de glucosa plasmática, glucógeno muscular y glucógeno hepático. Estos cambios metabólicos se asocian a un aumento de la oxidación de TG intramusculares (Jansson and Kaijser 1987; Kanaley et al. 1995), a pesar que la respuesta lipolítica es menor. En efecto, durante el esfuerzo submáximo a la misma intensidad absoluta, los sujetos entrenados presentan concentraciones plasmáticas de AGL menores (Koivisto et al. 1982; Martin et al. 1993), pero obtienen una mayor proporción de energía a partir de la oxidación de grasas, incluso sin aumentar la extracción de AGL de la sangre (Jansson and Kaijser 1987).

Kanaley y col. estudiaron a maratonianos y a sujetos moderadamente entrenados a intensidades relativas similares en función del umbral láctico (Kanaley et al. 1995). La intensidad subumbral fue de un 70 a un 72 % del  $VO_2$ max, mientras que la intensidad supraumbral fue de un 79 a un 86 % del  $VO_2$ max, en los sujetos moderadamente entrenados y en los maratonianos, respectivamente. Sin embargo, estos autores constataron que durante los primeros 30 minutos de ejercicio a intensidad subumbral, la cantidad de AG oxidados fue mayor en los maratonianos. Es decir, que incluso a la misma intensidad relativa, los sujetos entrenados en resistencia pueden obtener una mayor proporción de energía a partir de la oxidación de grasas, incluso aunque el grado de lipólisis no sea superior al que presen-



tan los sujetos menos entrenados. Por lo que el consumo máximo de oxígeno es un factor determinante de la capacidad de oxidación de grasas durante el ejercicio (Helge et al. 1999; Stisen et al. 2006).

Además, se sabe que el nivel de entrenamiento puede repercutir en el fenotipo de las fibras musculares (Aagaard et al. 2011; Andersen and Henriksson 1977), las cuales son muy importantes a la hora de determinar la capacidad de oxidar grasas (Holloszy 1967; Sahlin et al. 2007). Por un lado, las fibras tipo I tienen una mayor capacidad de oxidar grasas que las tipo II al tener una mayor densidad mitocondrial (Holloszy 1967; Sahlin et al. 2007), y este motivo explica el porqué contienen un mayor depósito de TGIM que las tipo II (Essen 1977; Froberg 1971; Schrauwen-Hinderling et al. 2005). Sin embargo, las fibras tipo II poseen un mayor depósito de glucógeno muscular (Soderlund et al. 1992).

Con el envejecimiento se pierde masa muscular y se gana masa grasa debido a cambios neuroendocrinos, como la disminución de la concentración plasmática de testosterona, como ocurre en los hombres con hipogonadismo (Seidman 2007). Se ha demostrado que la capacidad de oxidar grasas va disminuyendo con el envejecimiento, a pesar de ajustar los análisis estadísticos por masa corporal y composición corporal (Blaak et al. 1999). A edad más tempranas, los niños Tanner I tiene mayor capacidad máxima de oxidación de grasas, que va disminuyendo hasta la adolescencia (Riddell et al. 2008).

Por otro lado, se sabe que las mujeres tienen más grasa corporal que los hombres en términos absolutos y relativos (Clarys et al. 1999; Mittendorfer et al. 2003), lo que podría afectar a la oxidación de grasas. En efecto, muchos estudios demuestran que el ratio de oxidación de grasas durante el ejercicio es mayor en mujeres que en los hombres (entrenados y no entrenados) (Blatchford et al. 1985; Carter et al. 2001; Costill et al. 1979; Froberg and Pedersen 1984; Powers et al. 1980; Steffensen et al. 2002), mientras que otros han encontrado que las mujeres usan más grasa y menos hidratos de carbono que los hombres durante el ejercicio (Horton et al. 1998; Tarnopolsky et al. 1990). Sin embargo, estos resultados no concuerdan con la realidad creando una aparente paradoja, ya que las mujeres tienen más dificultades para perder masa grasa tras una intervención con ejercicio



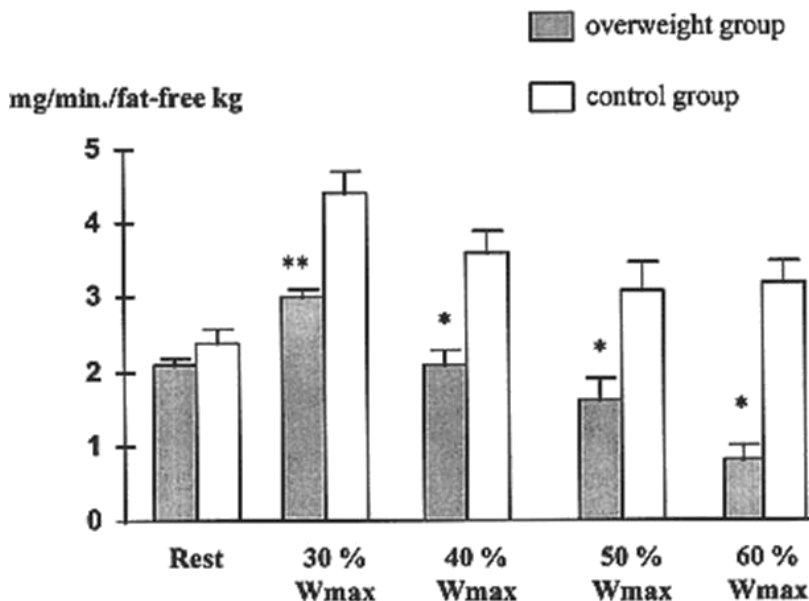
y/o entrenamiento (Ballor and Keeseey 1991; Donnelly and Smith 2005; Tarnopolsky et al. 1990). Este fenómeno se podría explicar con el artículo de Henderson y col. (2007), quienes midieron la activación de la lipólisis durante el ejercicio, pero también en el período de recuperación. Los datos demostraron que los hombres tienen más aumentada la oxidación de lípidos durante las tres horas del periodo de recuperación post-ejercicio comparados con las mujeres. Además, aclaran que la oxidación de lípidos permaneció aumentada aproximadamente 21 h después del ejercicio sólo en hombres, aclarando por tanto, las diferencias en las adaptaciones de pérdida de masa grasa entre géneros.

Al igual que ocurre con las diferencias de género, los estudios que comparan la oxidación de grasas entre obesos y delgados no son del todo claros. Las personas obesas poseen depósitos incrementados de TG tanto en el tejido adiposo como en el muscular, lo cual conlleva a desarrollar resistencia a la insulina (Phillips et al. 1996). El hecho de tener más acumulación de grasas podría estar relacionado con la menor capacidad de oxidar grasas que tienen los obesos comparados con sujetos con sobrepeso y a su vez, éstos con sujetos delgados (Keim et al. 1996; Mittendorfer et al. 2004; Perez-Martin et al. 2001) (Figura 8).

Las posibles causas atribuibles a esta disminución de la capacidad de oxidación de grasas en el músculo esquelético pueden ser (Holloway et al. 2009):

- 1.- Disfunción en la oxidación de AG en el interior de la mitocondria.
- 2.- Reducción del contenido mitocondrial en el músculo.
- 3.- Factores genéticos.

En efecto, algunos autores han demostrado que las mitocondrias de los músculos de personas obesas poseen menos funcionalidad que la de los sujetos delgados, viéndose comprometida la actividad de CPT, CS y HAD (Colberg et al. 1995; Holloway et al. 2009; Raben et al. 1998), la actividad de los complejos de la cadena de electrones de la respiración mitocondrial (Bakkman et al. 2010), y de marcadores de densidad mitocondrial como es la actividad de CS, HAD, PGC-1alfa y SIRT1 (Holloway et al. 2009; Jiang et al. 2003; Lagouge et al. 2006).



**Figura 8.** Ratio de la oxidación de grasas en reposo y durante el ejercicio en sujeto con sobrepeso y controles (delgados). Datos expresados como mg/min/masa libre de grasa en kg. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p > 0.005$ . (Mann-Whitney test). Imagen perteneciente al artículo de **Perez-Martin et al. Diabetes Metab. (2001)**.

Y por último, existen múltiples variaciones genéticas, más conocidas como polimorfismos que se asocian con una capacidad disminuida de oxidar grasas y a la obesidad (Chang et al. 2011; Liu et al. 2007; Pankov Iu 2010; Peeters et al. 2008). En esta tesis, nos centraremos entre otros factores en el polimorfismo del receptor de andrógenos, el cual podría influir directamente en la masa grasa corporal y su oxidación durante en el ejercicio.

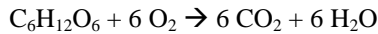
#### 1.1.4. Calorimetría indirecta

En los primeros años, Zuntz (Zuntz 1896), Krogh y Lindhart (1920) y más tarde Christensen y Hansen (1939) demostraron que en reposo, y durante el ejercicio, se utiliza una mezcla de carbohidratos y grasas. Basados en el hecho de que los carbohidratos producen diferentes cantidades de  $CO_2$  y requieren diferentes cantidades de  $O_2$  cuando son oxidados, estos investigadores utilizaron mediciones de  $VO_2$  y  $VCO_2$  en gases espirados para obtener información acerca de la utilización de sustratos. El cociente  $VCO_2/VO_2$  en el aire espirado, es el índice de inter-



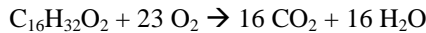
cambio respiratorio (RER), que es similar al cociente respiratorio que ocurre en los tejidos (RQ). Puede ser de 0.69-0.73 cuando se oxidan sólo grasas (dependiendo del largo de la cadena de carbono del ácido graso oxidado), y puede ser 1.0 cuando se oxida sólo glucosa.

La oxidación de una molécula de glucosa:



$$\text{RQ} = \frac{\text{VCO}_2}{\text{VO}_2} = \frac{6 \text{ mol de CO}_2}{6 \text{ mol de O}_2} = 1.00$$

La oxidación de una molécula de ácido palmítico (ac. graso tipo):



$$\text{RQ} = \frac{\text{VCO}_2}{\text{VO}_2} = \frac{16 \text{ mol de CO}_2}{23 \text{ mol de O}_2} = 0.70$$

El rango en el que oscila el valor de RQ comprende las medidas de fuentes de energía mixtas entre HCO y AG. Sin embargo, se pueden encontrar valores por encima de 1.00 durante el ejercicio, pero esto es debido a que se hiperventila y a que se produce un estado de acidosis metabólica. Ambos factores contribuyen a aumentar la producción de  $\text{CO}_2$  ( $\text{VCO}_2$ ) y en consecuencia, los valores de RQ pueden ser superiores a 1.00, ocurriendo principalmente a intensidades de esfuerzo superiores a las correspondientes al umbral anaeróbico.

Las contribución de las proteínas al gasto energético se puede estimar midiendo en la orina la concentración de urea, proveniente de la degradación de proteínas. Sin embargo, se ha estimado que el aporte proteico en pruebas de calorimetría indirecta es mínimo, por lo que se suele desestimar (Jeukendrup and Wallis 2005; Wagenmakers 1998). De hecho, las ecuaciones de oxidación de sustratos, provienen de tablas realizadas con valores RQ no proteicos (Peronnet and Massicotte 1991).





Los primeros estudios que usaron la calorimetría indirecta a través de los gases, no sólo demostraron que tanto carbohidratos como grasas fueron utilizados durante el ejercicio, sino también que sus contribuciones relativas cambiaron dependiendo de la intensidad, la duración del ejercicio y la dieta previa al mismo (Christensen and Hansen 1939; Edwards et al. 1934; Krogh and Lindhard 1920).

Originariamente, los gases expirados eran recolectados dentro de unas bolsas grandes de plástico (saco de Douglas). Más tarde, sobre 1940 aparecieron los primeros equipos portátiles, donde un medidor de gases era fijado en la espalda de los sujetos que recolectaba el volumen de aire expirado. Estos aparatos fueron mejorando su calidad, permitiendo evaluar el aire expirado respiración a respiración, que con la ayuda de computadores permitieron obtener los resultados de forma mucho más rápida (Wilmore et al. 1976). Sin embargo, el saco de Douglas sigue siendo el *gold standard* para medidas indirectas, aunque los nuevos dispositivos han llegado a ser muy fiables y comparables con el saco de Douglas (Carter and Jeukendrup 2002; Rietjens et al. 2001; Schulz et al. 1997).

Existen en la literatura científica varias ecuaciones para el cálculo de oxidación de sustratos. Desde hace 80 años, se ha intentado optimizar estas ecuaciones para hacerlas cada vez más fiables (Consolazio et al. 1963; Ferrannini 1988) (Frayn 1983; Lusk 1924, 1928; Peronnet and Massicotte 1991). Por ejemplo, Lusk (1924, 1928) se basó en los cálculos de oxidación de grasa sobre el análisis de manteca de cerdo, ya que era la mejor información de aquella época. Consolazio y col. (1963) usaron la glucosa y el ácido palmítico como las bases de sus cálculos. Se utilizó el ácido palmítico porque es el AG más común en la dieta humana y también en plasma. Sin embargo, Frayn (1983) usó el palmitoil-oleoil-estearoil-glicerol porque este TG era muy similar a la composición media del tejido adiposo humano. Por otro lado, Ferrannini (1988) usó tripalmitoil glicerol ya que se parecía bastante al usado por Frayn (1983) y al ácido palmítico. Finalmente, Peronnet y Massicotte (1991) intentaron ser un poco más preciso, y basaron sus cálculos sobre la media de los pesos de 13 AG diferentes, los cuales representaban el 99% de todos los AG del tejido adiposo humano. Sin embargo, la diferencia entre estas ecuaciones suponen sólo un 6% de variación (Jeukendrup



and Wallis 2005). Aún así, las ecuaciones más utilizadas en el campo de la investigación son las presentadas por Frayn (1983).

- HCO oxidados (g/min) =  $4.55 \cdot VCO_2$  (L/min) -  $3.21 \cdot VO_2$  (L/min) -  $2.87 \cdot n$
- AG oxidados (g/min) =  $1.67 \cdot VO_2$  (L/min) -  $1.67 \cdot VCO_2$  (L/min) -  $1.92 \cdot n$

Siendo n el valor de la excreción urinaria de nitrógeno proveniente de la degradación de proteínas para los casos de que se quiera tener en cuenta.

El protocolo de ejercicio para determinar la oxidación máxima de grasa y a qué intensidad de esfuerzo ocurre, han sido validados frente a cargas constantes en días separados (Achten et al. 2002). El protocolo se realizó en cicloergómetro con incrementos de 35-W cada 5 minutos hasta el agotamiento. Al final de cada carga, la oxidación de grasa fue determinada por calorimetría indirecta. Los resultados no mostraron ninguna diferencia al ser comparados con los valores de las cargas constantes realizadas en días diferentes. A su vez, el mismo estudió validó un protocolo más corto, donde se usaban las mismas cargas de 35-W, pero los incrementos sucedían cada 3 minutos, encontrando resultados comparables. La calorimetría indirecta, requiere de una medición en reposo, la cual se debe hacer en una camilla tumbado y relajado para tener el metabolismo basal. La duración de esta medición oscila entre 10 y 30 minutos según la estabilidad de las medidas.

La calorimetría indirecta es una de las técnicas más importantes y usadas para el estudio del metabolismo los sustratos energéticos del tanto en reposo como en ejercicio. Sin embargo, con la calorimetría indirecta no se puede determinar de dónde proceden los ácidos oxidados durante el ejercicio.

## 1.2. Perfil hormonal y masa grasa

Como ya comentamos previamente a lo largo del punto 1.1 de la introducción, la acumulación, movilización y oxidación de grasa puede estar determinada por la respuesta hormonal ante diferentes estímulos como puede ser el ejercicio. En este sentido, esta tesis se centrará en los efectos de la osteocalcina, la testosterona y la leptina por su contrastada influencia en el tejido adiposo.



### **1.2.1. Osteocalcina**

Recientemente, algunas investigaciones descubrieron que la osteocalcina, una proteína producida casi exclusivamente por los osteoblastos -las células responsables de la mineralización de los huesos-, no tiene sólo una función estructural, sino que es una hormona con diferentes funciones (Lee et al. 2007). En efecto, la regulación de la remodelación ósea por parte de la osteocalcina, implica que el hueso puede ejercer un feedback que controla la regulación de la homeostasis energética, y por tanto de la masa grasa (Ferron et al. 2008; Lee et al. 2007; Pittas et al. 2009).

Este artículo realizado por Lee y col. (2007), publicado en la revista Cell, demuestra que las células óseas liberan una hormona llamada osteocalcina, que controla la regulación de la glucosa en sangre y el depósito de grasas. La osteocalcina aumenta tanto la secreción como la sensibilidad a la insulina, además de aumentar la capacidad de reducir las reservas de grasa, evitando el desarrollo de diabetes tipo 2 y obesidad en ratones (Lee et al. 2007).

Los animales con niveles elevados de osteocalcina son resistentes a desarrollar obesidad y diabetes aunque consuman una dieta alta en grasas (Lee et al. 2007). Al contrario, los ratones cuya hormona esquelética no funciona desarrollan diabetes tipo 2, aumentan de peso, almacenan más grasa corporal, tienen menos insulina y una menor cantidad de células beta productoras de insulina (Lee et al. 2007).

A su vez, la osteocalcina podría actuar sobre los adipocitos afectando la regulación de hormonas como la leptina y la adiponectina, que podrían inducir la sensibilidad a la insulina y la oxidación de AG en músculo e hígado (Ahn et al. 2010; Guadalupe-Grau et al. 2009; Hinoi et al. 2008; Yamauchi et al. 2002). En efecto, la osteocalcina y la leptina correlacionan negativamente, al igual que con la masa grasa (Guadalupe-Grau et al. 2009; Kindblom et al. 2009; Pittas et al. 2009).

Por otro lado, los niveles de osteocalcina sérica están relacionados también con los niveles de testosterona en mujeres (Ahn et al. 2010), y en hombres la



osteocalcina estimula la producción de testosterona actuando en las células de Leydig en los testículos (Oury et al. 2011).

### 1.2.2. *Andrógenos*

Los andrógenos son hormonas sexuales masculinas, cuyos principales componentes son la testosterona, la androsterona y la androstendiona. Los andrógenos son esteroides del tipo C-19 secretados principalmente por los testículos y las glándulas adrenales, y en las mujeres en menor medida por los ovarios. 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).

La testosterona es una hormona anabólica, teniendo un efecto contrastado sobre la masa muscular y tejido adiposo. Los andrógenos estimulan la síntesis de proteínas y el crecimiento muscular (Bhasin et al. 1997; 2001). Además, los andrógenos inhiben la capacidad de formación y diferenciación de adipocitos, reduciendo su capacidad para almacenar lípidos bloqueando a través del receptor de andrógenos la activación de factores genéticos relacionados con la adipogénesis (Singh et al. 2006). Además, la testosterona también inhibe la actividad de LPL y la captación de lípidos en los adipocitos (Ramirez et al. 1997), y también inhibe la secreción de leptina (Behre et al. 1997; Luukkaa et al. 1998; Wabitsch et al. 1997).

Los hombres con deficiencia en los niveles plasmáticos de andrógenos (hipogonadismo) o deficiencia en el receptor de andrógenos, presentan mayor ganancia de masa grasa y pérdida de masa muscular que los sujetos normales (Matsumoto et al. 2003; Mauras et al. 1998).

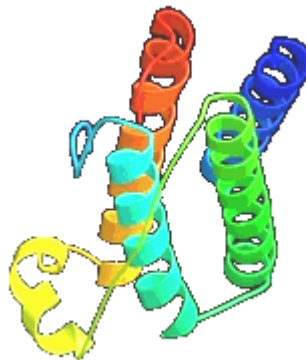
Por otro lado, las personas obesas presentan niveles de testosterona circulantes inferiores a los observados en sujetos delgados, permitiendo un exceso plasmático de la hormona leptina, pudiendo llegar a desarrollar resistencia a la leptina (Knight et al. 2010).

Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en hombres, la obesidad en mujeres aumenta la incidencia de hiperandrogenismo, a pesar del incremento de los

niveles de leptina (Gambineri et al. 2002; Pusalkar et al. 2010). El hiperinsulinismo provocado por la obesidad se ha relacionado con el desarrollo de hiperandrogenismo en las mujeres premenopáusicas a través de sus efectos directos sobre el ovario (Nader et al. 1993). Por lo que los efectos de los andrógenos y su paradoja sobre la masa grasa y la leptina en las mujeres deben ser estudiados más a fondo.

### 1.2.3. *Leptina*

El descubrimiento de la leptina a finales del año 1994 (Zhang et al.), supuso un paso muy importante en el conocimiento de los mecanismos moleculares mediados por los diferentes factores producidos por el tejido adiposo sobre la homeostasis energética. La leptina es una hormona de 16 KDa producida por los adipocitos en proporción directa a la masa grasa y actúa disminuyendo el apetito y aumentando el metabolismo basal a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Figura 9) (Dulloo et al. 2002; Friedman and Halaas 1998; Muoio et al. 1999; Wauters et al. 2002). Se ha observado cómo una mutación en el gen *ob*, el cual codifica la leptina, produce obesidad en ratones (Campfield et al. 1995; Halaas et al. 1995; Pelleymounter et al. 1995; Zhang et al. 1994). Esta mutación, muy poco frecuente en humanos, produce hiperplasia del tejido adiposo, obesidad mórbida e hipogonadismo hipotalámico (Montague et al. 1997; Rau et al. 1999; Strobel et al. 1998).



**Figura 9.** Estructura de la Leptina. La proteína madura de 146 aminoácidos tiene un peso molecular de 16 kDa y posee una estructura terciaria con un conjunto de cuatro hélices, similar a las citoquinas de cadena larga.



Los niveles circulantes de leptina correlacionan directamente con el índice de masa corporal (IMC) y con la cantidad total de masa grasa (Banks 2004; Fruhbeck 2001; 1998). Por lo tanto, cualquier aumento en la masa grasa total producirá mayores niveles circulantes de leptina (Considine and Caro 1997; Friedman and Halaas 1998), y viceversa. La reducción de las reservas de grasa corporal por la práctica regular de actividad física o por la dieta produce un descenso en las concentraciones plasmáticas de la hormona (Houmard et al. 2000; Perusse et al. 1997; Thong et al. 2000).

Aunque la leptina es mayoritariamente producida y secretada al torrente sanguíneo por los adipocitos, esta no es la única fuente potencial de la hormona. Existen otros tejidos que son capaces de producir pequeñas cantidades de leptina en determinadas circunstancias; entre ellos cabe destacar la placenta, la mucosa gástrica, la médula ósea, el epitelio de la glándula mamaria, el músculo esquelético, la pituitaria, el hipotálamo y el hueso (Ahima and Flier 2000; Bado et al. 1998; Masuzaki et al. 1997; Morash et al. 1999).

Inicialmente se pensó que los efectos de la leptina se producían únicamente a nivel central, sin embargo, actualmente se sabe que la leptina es una hormona pleiotrópica que ejerce funciones fisiológicas tanto en el SNC como en múltiples tejidos periféricos (Akerman et al. 2002; Baratta 2002; Bjorbaek and Kahn 2004; Fruhbeck 2001, 2002; Harvey and Ashford 2003; Muoio and Lynis Dohm 2002). La leptina controla el apetito a nivel hipotalámico a través de la estimulación de la expresión de péptidos anorexigénicos como POMC (Proopiomelanocortin) y CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcrip) y la inhibición de la expresión de péptidos orexigénicos como NPY (Neuropeptide Y) y AGRP (Agouti Related Peptide) (Elmquist et al. 1999; Flier and Maratos-Flier 1998; Sawchenko 1998). Entre los diferentes tejidos periféricos diana de la acción de la leptina se encuentra el músculo esquelético, principal tejido regulador del metabolismo basal y uno de los principales moduladores del metabolismo de los ácidos grasos y de la glucosa (Steinberg and Dyck 2000). En este tejido, la hormona actúa incrementando la oxidación de ácidos grasos, reduciendo la acumulación de grasa intramuscular y aumentando la captación de glucosa y el gasto energético



(Argiles et al. 2005; Berti and Gammeltoft 1999; Ceddia et al. 2001; Muoio and Lynis Dohm 2002; Steinberg et al. 2002; Yaspelkis et al. 2001).

El descubrimiento de esta hormona ha permitido en los últimos años un gran avance en el conocimiento de la regulación de la ingesta de alimentos (apetito) y del control del peso corporal, de la diabetes, el metabolismo, la reproducción, la respuesta inmune, la fisiopatología cardiovascular, la función respiratoria y el crecimiento y desarrollo (Ahima and Flier 2000; Fruhbeck 2006). El hecho de que esta hormona ejerza acciones sobre múltiples tejidos ha supuesto que en los últimos años se haya realizado un gran esfuerzo investigador con el objeto de profundizar en el conocimiento de las diferentes vías bioquímicas y moleculares activadas por la leptina y que gobiernan los diferentes efectos de la hormona, lo cual podría tener importantes implicaciones en el tratamiento de algunas patologías, como la obesidad.

#### ***1.2.3.1. Receptores de leptina***

La naturaleza pleiotrópica de las acciones de la leptina se debe a la distribución universal de su receptor. La hormona ejerce sus acciones, tanto a nivel central como a nivel periférico (Considine and Caro 1997; Friedman and Halaas 1998; Gallagher et al. 2005; Guerra et al. 2007), interaccionando con receptores transmembrana (OB-Rs) que poseen una estructura muy similar a los pertenecientes a la familia de receptores de citocinas de la clase I (Tartaglia 1997; White and Tartaglia 1996). Existen al menos seis isoformas de OB-Rs, designadas como: OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, OB-Re y Ob-Rf; generadas por procesamiento alternativo de un único ARNm y/o por procesamiento proteolítico de los productos proteicos subsecuentes (Chua et al. 1997; Lee et al. 1996; Tartaglia 1997). Todas estas isoformas poseen en común un dominio extracelular de unos 800 aminoácidos y un dominio transmembrana de 34 aminoácidos; y difieren en el dominio intracelular que es característico de cada isoforma (Chua et al. 1997; Lee et al. 1996; Tartaglia 1997). En función de estos dominios, las isoformas puede clasificarse en: corta, secretada o soluble y larga, siendo esta última la isoforma funcional del receptor (Chua et al. 1997; Tartaglia 1997; Tartaglia et al. 1995).



Se ha observado que la ausencia de OB-Rb es la responsable del fenotipo obeso del ratón db/db y de la rata fa/fa (Chua et al. 1996). Además, recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado que los sujetos obesos tienen disminuida la expresión de OB-Rb comparados con sujetos controles, siendo una posible causa del desarrollo de resistencia a la leptina (Fuentes et al. 2010).

Otros estudios han demostrado que la eliminación selectiva de todas las isoformas de OB-R en neuronas produce obesidad en ratones, lo que evidencia la importancia de la acción neuronal de la leptina en lo que se refiere a la modulación del peso corporal (Cohen et al. 2001).

El ejercicio regular en ratas llevado a cabo durante doce semanas redujo la cantidad de ARNm de OB-Rb en el núcleo arcuato del hipotálamo (Kimura et al. 2004). En cuanto a la influencia del entrenamiento crónico sobre los receptores de leptina en músculo esquelético humano, en nuestro grupo de investigación hemos demostrado que la expresión proteica de OB-Rb en el tríceps braquial del brazo dominante de tenistas profesionales es mayor que en brazo no dominante (Olmedillas et al. 2010), lo que sugiere que el entrenamiento podría modular positivamente la expresión del receptor.

En los últimos años se han aportado numerosas evidencias experimentales que documentan ampliamente la oxidación de grasas y captación de glucosa a través de la AMPK (5'-AMP-Activated Protein Kinase), mediado por la cascada de señalización de la leptina. Un estudio particularmente interesante ha demostrado que la inyección intravenosa de leptina incrementa la fosforilación de la AMPK $\alpha$ 2 en músculo esquelético, efecto que es más acusado en las fibras de contracción lenta (Minokoshi et al. 2002) y que depende de la unión de la leptina al receptor OB-Rb (Guerra et al. 2011; Minokoshi et al. 2002).

### **1.2.3.2. AMPK y oxidación de grasa**

El nombre de AMPK fue adoptado en 1987 (Carling et al.), no obstante, la enzima fue descubierta en 1973 (Carlson and Kim 1973). La AMPK es una enzima heterotrimérica compuesta por una subunidad catalítica ( $\alpha$ ) y dos subunidades reguladoras ( $\beta$  y  $\gamma$ ) (Kahn et al. 2005), cuya expresión está regulada por múltiples





genes que codifican cada una de las subunidades ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ) (Mahlpuu et al. 2004). En total se pueden formar 12 heterotrímeros diferentes de AMPK, cuyo patrón de expresión muestra gran pleiotropismo (Barnes et al. 2004) (Steinberg and Jorgensen 2007). La función específica de cada uno de los heterotrímeros aún no ha sido aclarada, pero se ha demostrado que los ratones knockout para AMPK $\alpha 2$  desarrollan obesidad y diabetes tipo 2 (Viollet et al. 2003).

En el músculo esquelético la mayoría de los complejos contienen  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  (Steinberg and Jorgensen 2007). Un 20% de estos complejos  $\alpha 2/\beta 2$  están asociados a  $\gamma 3$ , mientras que el resto se encuentran mayoritariamente asociados a  $\gamma 1$  (Wojtaszewski et al. 2005). Aunque la isoforma  $\alpha 1$  se ha encontrado en extractos musculares, existe evidencia experimental para sugerir que procede de otras células diferentes a las fibras musculares (Fujii et al. 2000). En este tejido, la actividad de la AMPK depende principalmente de la fosforilación de la treonina 172 en el asa de activación de la subunidad  $\alpha$  por la quinasa LKB1 (Hawley et al. 2003) (Alessi et al. 2006; Sriwijitkamol et al. 2006), antes llamada quinasa de AMPK (AMPKK). La LKB1 también se activa por AMP (Ponticos et al. 1998). Los ratones transgénicos que carecen de LKB1 tienen una muy escasa actividad AMPK $\alpha 2$  (Sakamoto et al. 2005), lo que confirma la importancia de esta quinasa para la activación de AMPK. Además, también se ha demostrado que el AMP es incapaz de activar a la AMPK en ausencia de LKB1 (Sakamoto et al. 2005). La activación de LKB1 también depende de su fosforilación en el residuo Ser431 a través de la vía de las MAPK, concretamente de la última efectora de esta vía, que es ERK (Extracellular Regulated Kinases) (Banks et al. 2000). La fosforilación de ERK inducida por la unión de la leptina con OB-R viene determinada previamente por la fosforilación directa de JAK2 (Janus Kinase 2) del Box1 y de la tirosina 985 del OB-R que podría estimular la señalización de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Fruhbeck 2006; Guerra et al. 2011).

La AMPK es activada por tanto, ante cualquier estrés celular que produzca un incremento del ratio AMP/ATP, como por ejemplo el ejercicio de sprint en músculo esquelético humano (Guerra et al. 2010).



La principal función de la AMPK en el músculo esquelético es la de estimular la oxidación de ácidos grasos al fosforilar a la ACC (Acetil Coenzima-A Carboxilasa), actuando como un “sensor de combustible” que controla el estatus energético de las células (Minokoshi et al. 2002; Tanaka et al. 2005). La ACC fosforilada queda inactivada y deja de producir malonil-CoA. El malonil-CoA es un inhibidor alostérico de la actividad CPTI (Carnitina Palmitoiltransferasa I), responsable del transporte de ácidos grasos de cadena larga al interior de las mitocondrias (Ruderman et al. 1999). En el músculo esquelético predomina la isoforma  $\beta$  (ACC- $\beta$ ) (Minokoshi et al. 2002). Se ha demostrado que ratones Knockout para ACC- $\beta$  muestran un incremento en la oxidación de ácidos grasos en el músculo y un nivel de adiposidad reducido (Minokoshi et al. 2002). Sin embargo, evidencias experimentales recientes indican que podría existir una disociación entre la fosforilación de la AMPK y de la ACC en respuesta al ejercicio de sprint en músculo esquelético humano (Guerra et al. 2010).

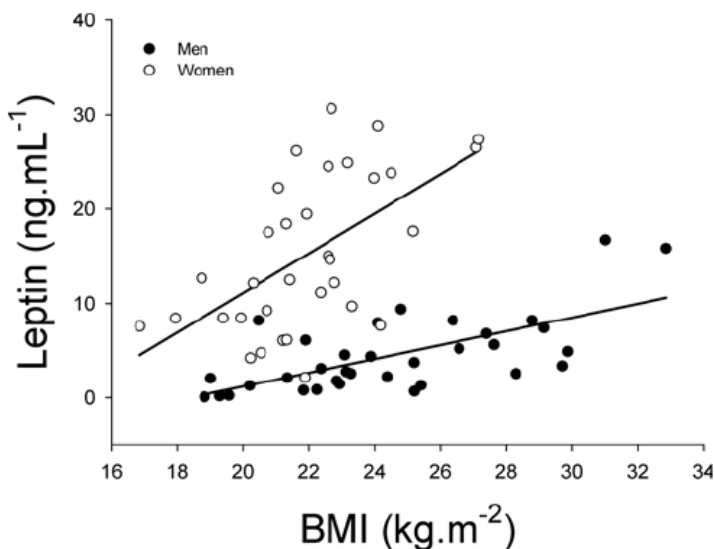
Además, también se ha demostrado que un incremento de la actividad de la AMPK muscular produce un aumento del transporte de glucosa al interior de la fibra (Steinberg and Jorgensen 2007). Esta última evidencia experimental vuelve a poner de manifiesto la interacción en la señalización activada por insulina y leptina.

Estudios realizados en ratones transgénicos que sobre-expresan leptina que han demostrado que los niveles permanentemente elevados de la hormona producen activación crónica de la AMPK en las fibras musculares lentas (Tanaka et al. 2005). Estos ratones son delgados y adelgazan más rápidamente que los ratones normales cuando son sometidos a una dieta hipercalórica. Sin embargo, es especialmente importante destacar que a pesar de presentar unos niveles crónicamente elevados de leptina, no muestran signos de resistencia a la acción de la hormona, contrariamente a lo observado en seres humanos obesos que presentan hiperleptinemia y resistencia a la acción de la leptina. En contraste con lo observado en los ratones transgénicos, la actividad basal de la AMPK parece no estar modificada en obesos (Steinberg et al. 2004) o ligeramente disminuida (Bandyopadhyay et al. 2006), tal vez debido a la resistencia a la acción de la leptina. En cualquier caso

es necesario realizar estudios con una muestra amplia de sujetos con diversos niveles de obesidad para poder establecer si existe alguna relación entre composición corporal, leptina y actividad AMPK en músculo esquelético en seres humanos.

#### 1.2.4. Dimorfismo sexual

En humanos, existe un dimorfismo sexual en los niveles circulantes de la hormona leptina puesto que, incluso para un mismo IMC, las mujeres tienen niveles plasmáticos de leptina superiores a los hombres (Figura 10) (Guerra et al. 2008; Saad et al. 1997; Sinha et al. 1996; Wong et al. 2004). Este fenómeno puede ser explicado porque los estrógenos estimulan la producción de leptina, mientras que los andrógenos la reducen (Wong et al., 2004). A su vez, los estrógenos podría reducir los niveles de osteocalcina, hormona que como explicamos previamente tiene un efecto inhibitorio sobre los niveles de leptina (Turner et al. 1990).



**Figura 10.** Relación entre la concentración basal de leptina sérica y el índice de masa corporal (IMC), en hombres y mujeres. Los datos fueron ajustados por el porcentaje de grasa corporal. Imagen adquirida del artículo de Guerra y col. (2008).



A su vez, los niveles de expresión proteica a nivel basal de OB-Rb están incrementados en un 41% en mujeres comparados con hombres (Guerra et al. 2008), pudiendo ser una de las razones por la cual las mujeres pueden oxidar más grasas que los hombres durante el ejercicio antes la misma intensidad relativa.

A pesar de la influencia negativa que tiene los andrógenos sobre la leptina y la masa grasa, las mujeres obesas poseen mayores niveles de testosterona circulantes (Gambineri et al. 2002; Pusalkar et al. 2010). Por lo tanto, estudios que diluciden el mecanismo de acción de los andrógenos y su receptor, sobre la masa grasa y leptina en mujeres deben llevarse a cabo.

### 1.3. Receptor de andrógenos y masa grasa

La testosterona 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).

Estudios previos han demostrado que ratones knockout para el receptor de andrógenos (AR<sup>-y</sup>) desarrollan obesidad, con resistencia a la insulina y a la leptina, acompañado de alteraciones metabólicas de perfil lipídico e hiperleptinemia (Lin et al. 2005; Yu et al. 2008). Estos datos sugieren que la acción de andrógenos plasmáticos sobre el AR, pueden jugar un rol regulatorio directo en la síntesis y secreción de leptina por los adipocitos. Esta asociación entre andrógenos, leptina y masa grasa puede estar modulada por las variaciones polimórficas en los AR (Guadalupe-Grau et al. 2010; 2011; Nielsen et al. 2010; Zitzmann et al. 2003).

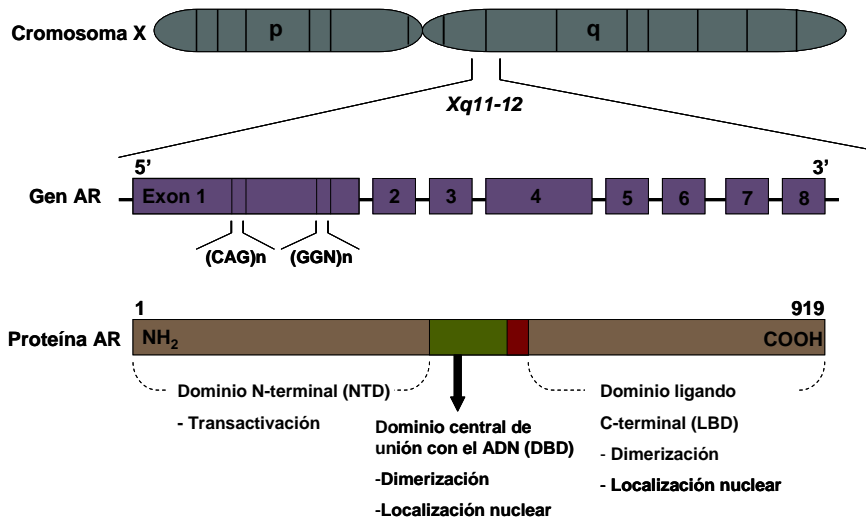


### ***1.3.1. Polimorfismo del receptor de andrógenos***

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 (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 11). 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).



**Figura 11.** 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).

La repetición CAG varía en longitud o número de repeticiones entre 8 y 35, siendo la mediana 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), siendo la mediana de 23 (residuos de glicina) en varones y en mujeres caucásicos, incluida la población canaria (Ding et al. 2005; Rodríguez-Gonzalez et al. 2009; Rodríguez et al. 2006). 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 e infertilidad masculina (Giovannucci et al. 1997; Kukuvtis et al. 2002) (Mitsumori et al. 1999; Rodriguez-Gonzalez et al. 2009).

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).

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). 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).

#### ***1.3.1.1. Efectos sobre el perfil hormonal y la grasa corporal***

En humanos, un menor número de repeticiones de los polimorfismos CAG ha sido relacionado con mayores concentraciones sistémicas de testosterona total y libre (Crabbe et al. 2007; Huhtaniemi et al. 2009; Krithivas et al. 1999; Stanworth et al. 2008). Sin embargo, otros autores no han encontrado ningún tipo de asociación entre la longitud de CAG y los niveles de testosterona (Gonzalez



Hernandez et al. 2008; Nielsen et al. 2010; Skjaerpe et al. 2010; Stiger et al. 2008; Van Pottelbergh et al. 2001), ni cuando los grupos fueron separados por cuartiles (Andersen et al. 2011).

A su vez, un mayor número de repeticiones de los polimorfismos CAG parece asociarse a un mayor nivel de leptina en plasma y masa grasa (Nielsen et al. 2010; Stanworth et al. 2008; Zitzmann et al. 2003), pudiendo ser explicado por un nivel más alto de las concentraciones de testosterona en plasma (Bogaert et al. 2009). Sin embargo, otros autores han comunicado que el polimorfismo CAG no tiene ninguna correlación con la masa grasa ni con los niveles de leptina en sangre (Gonzalez Hernandez et al. 2008; Goutou et al. 2009; Lapauw et al. 2007).

Sin embargo, el polimorfismo GGN del AR ha sido menos estudiado. Parece, por un lado, que existe una asociación positiva entre el polimorfismo de GGN y los niveles de testosterona (Bogaert et al. 2009). Sin embargo, por otro lado, no se han encontrado en otros estudios ningún tipo de relación entre GGN y los niveles de testosterona (Skjaerpe et al. 2010), creando la misma controversia que con CAG.

Gustafson y col. (2003) observaron en hombres edad media y avanzada que poseían un polimorfismo de GGN diferente a 17 y un CAG corto ( $\leq 23$ ) mostraban mayores ratios de valores antropométricos relacionados con la obesidad.

Sin embargo, deben realizarse más estudios que describan por un lado la posible interacción entre las posibles combinaciones de repeticiones del polimorfismo CAG y GGN con la masa grasa, leptina, osteocalcina y testosterona. Y por otro lado, para dilucidar el efecto de polimorfismos extremos sobre la acumulación de grasa, la respuesta lipolítica al ejercicio, leptina, osteocalcina y testosterona. A su vez, ningún estudio longitudinal ha sido descrito hasta la fecha para ver la posible interacción entre el polimorfismo del AR y la masa grasa.

Estos dos últimos puntos, serán gran parte del contenido de los objetivos que se desarrollarán a lo largo de esta tesis.



# **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**





## 2. Objetivos

1. Determinar tanto en brazos como en piernas la capacidad máxima de oxidación de grasas, y su relación con la actividad enzimática mitocondrial, así como con la fosforilación basal de AMPK y ACC, en sujetos obesos, postobesos y controles. (*Estudio I*).
2. Determinar si los polimorfismos del receptor de andrógenos están asociados a la masa grasa y su distribución regional en hombres y mujeres sanos. (*Estudio II*).
3. Evaluar si los polimorfismos del receptor de andrógenos están asociados a los valores basales en suero de osteocalcina, andrógenos y leptina en hombres y mujeres sanos. (*Estudio II y III*).
4. Determinar en hombres sanos si los polimorfismos extremos cortos del receptor de andrógenos (<25 percentil) tienen mayor capacidad de oxidación de grasas que aquellos que poseen los polimorfismos extremos largos del receptor de andrógenos (<75 percentil). (*Estudio III*).
5. Determinar en hombres sanos, si los polimorfismos extremos cortos del receptor de andrógenos (<25 percentil) tienen menos acumulación de grasa, tanto en el cuerpo entero como en la región del tronco, tras el transcurso de los años, comparados con aquellos que poseen los polimorfismos extremos largos del receptor de andrógenos (<75 percentil). (*Estudio III*).



### 3. Hipótesis

1. La capacidad de oxidación de grasas está disminuida en sujetos obesos comparados con sujetos controles y post-obesos. (*Estudio I*).
2. Las diferencias en la capacidad de oxidación de grasas en sujetos obesos, post-obesos y controles es debida a una disminución en la actividad enzimática mitocondrial y a una menor fosforilación de AMPK o ACC a nivel basal. (*Estudio I*).
3. Los polimorfismos de repetición CAG y GGN largos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a una mayor masa grasa en hombres y mujeres. (*Estudio II y III*).
4. Los polimorfismos de repetición CAG y GGN cortos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a concentraciones séricas aumentadas de andrógenos (T) y osteocalcina, así como a concentraciones séricas de leptina disminuidas. (*Estudio II y III*).
5. La acumulación de grasa tras un período aproximado de 7 años será mayor en los sujetos con polimorfismos de repetición CAG y GGN largos del gen que codifica el receptor de andrógenos. (*Estudio III*).
6. La oxidación máxima de grasa estará aumentada en aquellos sujetos que posean polimorfismos de repetición CAG y GGN largos del gen que codifica el receptor de andrógenos. (*Estudio III*).

# **METODOLOGÍA**





## 4. Metodología

Todos los sujetos fueron instruidos para que no realizaran actividad física vigorosa, ni tomarán cafeína y/o derivados, bebidas energéticas, alcohol ni tabaco desde el día antes de los experimentos con test sensibles a estos factores como son la extracción de sangre, biopsia muscular y test relacionados con medidas de gases ventilatorios y de tolerancia a la glucosa. Además, los sujetos debieron pasar una noche en ayunas previo a estos test, pudiendo comer una vez finalizados.

### 4.1. Sujetos

Los valores medios de los parámetros edad, talla, peso corporal y porcentaje de grasa de los sujetos que participaron en cada estudio realizado se describen en la tabla 1.

#### Estudio I

Un total de 30 sujetos participaron en este estudio, y fueron divididos en 10 sujetos por cada grupo: post-obesos (PO), obesos (O) y controles (C). Los criterios de inclusión en el grupo post-obesos fueron los siguientes: 1) un índice de masa corporal (IMC) por debajo de  $30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ; 2) la pérdida de peso que no tuviera originada a través de fármacos o terapias quirúrgicas de al menos 10% de su peso corporal; y 3) peso estable en el momento del estudio ( $\pm 2 \text{ kg}$  y al menos 1 mes antes de comenzar los experimentos).

Intencionadamente, los tres grupos fueron ajustados por edad, y además los grupos C y PO fueron ajustados también por IMC. Además, los sujetos de cada grupo obtuvieron valores similares en talla, masa libre de grasa y consumo máximo de oxígeno ( $\text{VO}_{2\text{max}}$ ). Este último parámetro muy tenido en cuenta por su gran influencia en la capacidad de oxidación de grasas.

#### Estudio II

En este estudio participaron 309 hombres y 78 mujeres caucásicos. Ellos fueron reclutados entre los estudiantes universitarios, clubes deportivos y policía local de Gran Canaria. El reclutamiento de sujetos comenzó en Febrero del 2003



y terminó en Marzo del 2010. Todos los sujetos se sometieron a un examen médico.

Los criterios de inclusión fueron: 1) edad comprendida entre 18 y 60; 2) IMC por debajo de 35; 3) realizar algún tipo de actividad física-deportiva al menos una vez a la semana; 4) no fumadores, sin toma de medicamentos ni enfermedades crónicas, hipertensión o limitaciones ortopédicas.

***Estudio III***

Inicialmente este estudio comenzó con 319 hombres caucásicos, y fueron reclutados entre estudiantes universitarios, clubes deportivos y policía local de Gran Canaria. Todos los sujetos se sometieron a un examen médico. Los criterios de inclusión fueron los mismos que para el estudio II. Tras la determinación del polimorfismo del receptor de andrógenos, se volvió a llamar sólo a aquellos sujetos con casos extremos del polimorfismo del receptor de andrógenos (primer y cuarto cuartil) para participar en este estudio. Conseguimos volver a evaluar a aproximadamente el 50% de los posibles candidatos.

Este estudio realizado con casos de polimorfismos extremos se compone a su vez de dos partes: 1) estudio transversal; y 2) estudio longitudinal que comenzó las primeras medidas en Febrero del 2003 y terminó con unas segundas medidas en Agosto del 2010.

**Tabla 1.** Características de los sujetos.

	Estudio I			Estudio II		Estudio III	
	Postobesos n=10	Obesos n=10	Control n=10	Hombres n=309	Mujeres n=78	Hombres (n=319) Transv (n=46) Long (n=36)	
Edad (años)	31.5 ± 1.6	30.4 ± 2.3	31.2 ± 1.5	28.3 ± 7.6	24.8 ± 6.2	34.5 ± 8.0	30.2 ± 7.6
Talla (cm)	184 ± 2	184 ± 3	184 ± 3	177 ± 6	165 ± 6	177 ± 5	176 ± 6
Peso (kg)	90.2 ± 3.1	115.0 ± 5.4*	91.0 ± 4.2	77.8 ± 10.2	59.8 ± 7.5	83.3 ± 11.6	79.2 ± 10.5
Grasa corporal (%)	22.8 ± 1.8	34.9 ± 1.6*	24.7 ± 1.8	18.8 ± 7.4	28.0 ± 6.4	21.3 ± 6.3	19.9 ± 6.2

Datos representados como Media ± SD. \* (P<0.05) obesos comparados con postobesos y controles.





#### 4.2. Composición corporal

La composición corporal de los sujetos se analizó mediante absorciometría fotónica de rayos X (DXA) (Hologic QDR-1500, Hologic, software versión 7.10, Waltham, MA), tal como se describe en numerosos trabajos publicados por nuestro grupo de investigación (Ara et al. 2004; Guadalupe-Grau et al. 2010).

#### 4.3. Capacidad de salto

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, la rodilla a 90°, y durante el cual 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.

#### 4.4. 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; 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.

#### **4.5. 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 se registran 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 1 minuto de descanso.

#### **4.6. Test de oxidación máxima de grasas (MFO): calorimetría indirecta**

Tras una noche en ayunas, se midió el gasto energético basal en una camilla estando los sujetos acostados en posición supina y conectados al analizador de gases mediante máscara (Vmax N29; Sensormedics, California, USA) durante 30 minutos. Seguidamente, se realizó un test incremental en cicloergómetro para determinar la oxidación máxima de grasa (MFO) de las piernas y de los brazos, y a la intensidad que ésta tiene lugar (FatMax) (Achten et al. 2002). La prueba de piernas comenzó con un escalón inicial de 30 vatios durante 5 minutos, seguido de incrementos de 30 vatios cada 3 min. Cuando los sujetos llegaron a un RER > 1.0, el ejercicio fue detenido dejando terminar el correspondiente periodo de carga de 3 min. Después de 5 minutos de recuperación, el sujeto realizó un test incremental (30 W/min) a partir de la última carga de la prueba de MFO para determinar su  $VO_{2max}$ . Los sujetos fueron instruidos para mantener un ritmo de pedaleo a 80 rpm.

Para calcular el MFO de los brazos se uso un protocolo similar, pero cambiando la intensidad de las cargas, comenzando en una carga inicial de 5 min a 20 vatios, seguidos por incrementos de 15 vatios cada 3min. Cuando los sujetos llegaron a un RER > 1.0, el ejercicio fue detenido dejando terminar el correspondiente periodo de carga de 3 min. Después de 5 minutos de recupe-



ración, el sujeto realizó un test incremental (15 W/min) a partir de la última carga de la prueba de MFO para determinar su  $VO_{2max}$ . Los sujetos fueron instruidos para mantener un ritmo de pedaleo a 60 rpm. Este protocolo fue adaptado del protocolo publicado por Smith y col. (2006).

La oxidación de glucosa y grasas durante cada escalón del ejercicio fue calculado a partir de los valores medios de  $VO_2$  y  $VCO_2$  de los últimos 60 segundos de cada carga, utilizando las ecuaciones de calorimetría indirecta propuestas por Frayn (1983).

#### **4.7. Test de tolerancia a la glucosa**

Se realizó un test estándar de 120 min para determinar la tolerancia a la glucosa oral. Para ello, los sujetos ingirieron 75 g de glucosa disueltas en 300 ml de agua. La sangre capilar fue tomada antes y después del test para la medida de la concentración de glucosa plasmática (ABL, series 700; Radiometer, Copenhagen, Denmark).

#### **4.8. Biopsia muscular**

Las biopsias musculares de obtuvieron por punción bajo anestesia local del vasto lateral del cuádriceps y del deltoides, como se ha realizado en el laboratorio de Rendimiento Humano de la ULPGC en numerosas ocasiones usando la técnica de Bergstrom, tras una noche de ayuno. Con esta técnica se pueden obtener 40-60 mg de músculo (200 mg con aspiración) (Lundby et al. 2006). La biopsia muscular fue limpiada de tejido conectivo, de grasa visible y sangre usando un microscopio antes de ser analizada o guardada a  $-80^{\circ}C$ .

La muestra de biopsia muscular fue dividida en tres partes:

1. Para congelarla directamente en nitrógeno líquido, para su posterior análisis de análisis bioquímico y western blot.
2. Para fijarla en *Tissue-Tek* y congelarla en isopentano enfriado en nitrógeno líquido, para análisis histoquímico.
3. Y para ponerla dentro de solución BIOPS (ver Kutnesov y col. (2008)), y analizar inmediatamente la función mitocondrial.



#### **4.8.1. Análisis bioquímico**

La actividad máxima de HAD y CS fueron determinadas fluorométricamente en las muestras musculares de brazos y de piernas, como ha sido descrito previamente por otros (Andersen et al. 2003). La actividad de LHS fue evaluada como se ha descrito previamente (Langfort et al. 2003), y solamente en músculo de las piernas, por falta de muestra suficiente en brazos. El contenido de glucógeno y TG muscular fue medido enzimáticamente como ha sido descrito previamente (Helge and Dela 2003).

#### **4.8.2. Análisis mediante la técnica de Western blot**

Se trata de una técnica que permite la detección del grado de presencia de una proteína en estudio, mediante la separación diferencial según el peso molecular de esta proteína desnaturalizada, y la posterior exposición a anticuerpos específicos.

##### **4.8.2.1. Obtención de extractos proteicos a partir de biopsias musculares**

Para la obtención de los extractos proteicos de músculo esquelético humano, una pieza del tejido congelado fue homogeneizada en Buffer de Lisis de Urea (UREA 6 M- SDS 1% e Inhibidor de proteasas Complete 1X). Después de ser centrifugados durante 15 minutos a 20,000g, los extractos totales se transfirieron a tubos limpios y una alícuota de cada extracto fue separada para la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinónico (Smith et al. 1985).

##### **4.8.2.2. Separación de proteínas a través de la electroforesis**

Los extractos proteicos fueron diluidos en tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl pH 6.8, 62.50 mM, SDS 2.3%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol). A continuación se procedió a la separación electroforética de las proteínas en geles de acrilamida-bisacrilamida (7.5% - 10%) usando el sistema de Laemmli (Laemmli 1970), con las modificaciones convenientes (Marin et al. 2001). Estos geles permiten separar las proteínas por sus diferentes pesos moleculares.



#### 4.8.2.3. *Proceso de detección de proteínas*

Después de la separación electroforética de extractos totales de proteínas, se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de polivinilo (Hybond-P PVDF, Amersham Biosciences), la cual se realizó a 400 mA durante 90 minutos a 4°C.

Para evitar la unión no específica de los anticuerpos, las membranas fueron incubadas con un tampón de bloqueo al menos durante 1 hora a temperatura ambiente:

-Blotto blocking buffer (leche desnatada al 5% disuelta en tampón TBS con 0,1% del detergente Tween-20 (TBS-T)) para anticuerpos usados para la inmunodetección de proteínas diluidos en este buffer.

-BSA blocking buffer (Bovine Serum Albumin (BSA) al 4% disuelta en TBS-T) para anticuerpos usados para la inmunodetección de proteínas diluidos en este buffer.

La inmunodetección comenzó con la incubación de la membrana con el anticuerpo primario correspondiente (ver tabla 2). Las condiciones exactas de incubación para cada anticuerpo pueden ser consultadas en los artículos que componen esta tesis doctoral. Posteriormente a la incubación con los anticuerpos primarios y al lavado de las membranas en tampón TBS-T, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa de rábano. Esta incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente en blotto blocking buffer. La visualización de la reacción inmunológica se llevó a cabo por la reacción enzimática de la peroxidasa con un compuesto que emite luz al oxidarse (ECL+ Western Blotting Detection kyt, Amersham Biosciences). Las bandas específicas fueron visualizadas con el sistema Chemidoc XRS (Bio-Rad Laboratories) y analizadas con un programa informático de análisis de imagen (Quantity One©, Bio-Rad Laboratories).



**Tabla 2.** Anticuerpos y diluciones usadas en los ensayos Western blot.

ANTICUERPO PRIMARIO	PROVEEDOR	DILUCIÓN
<b>Monoclonal de ratón anti-<math>\alpha</math>-tubulina</b> (Guerra et al. 2008; Fuentes et al. 2010)	Biosigma (Madrid, España)	1:70.000
<b>Policlonal de conejo anti-SOCS3</b> (Guerra et al. 2008; Fuentes et al. 2010)	Santa Cruz (CA, USA)	1:500
<b>Policlonal de conejo anti-Thr<sup>172</sup>-AMPK<math>\alpha</math></b> (Guerra et al. 2010; Fuentes et al. 2010)	Cell Signalling Technology (Barcelona, España)	1:1.000
<b>Policlonal de conejo anti-AMPK<math>\alpha</math></b> (Guerra et al. 2010; Fuentes et al. 2010)	Cell Signalling Technology (Barcelona, España)	1:1.000
<b>Policlonal de conejo anti-ACC<math>\beta</math></b> (Guerra et al. 2010; Fuentes et al. 2010)	Cell Signalling Technology (Barcelona, España)	1:400
<b>Policlonal de conejo anti-fosfoACC<math>\beta</math> (Ser<sup>221</sup>)</b> (Guerra et al. 2010; Fuentes et al. 2010)	Cell Signalling Technology (Barcelona, España)	1:400

#### 4.8.3. Análisis histoquímico

La muestra de tejido muscular que fue inmediatamente montada e incluida en *Tissue-Tek* y congelada en isopentano enfriado con nitrógeno líquido se usó para el análisis histoquímico.

Los cortes de la sección transversal de la biopsia se realizaron en secciones de 10  $\mu$ m en un criostato a -20°C (LEICA, CM1850, Alemania). Los cortes fueron teñidos para la medición de la actividad ATPasa miofibrilar y para capilares musculares, como se ha descrito previamente (Brooke and Kaiser 1970; Qu et al. 1997). Más tarde se determinaron la composición, tamaño y densidad capilar del tipo de fibras, usando un sistema de cuantificación computarizado (Tema Scan-beam, Hadsund, Denmark (Andersen and Aagaard 2000; Qu et al. 1997). Se analizaron una media de 150 $\pm$ 12 fibras.



#### ***4.8.4. Protocolo de medición de la respiración mitocondrial***

Aplicamos una versión de protocolo (Larsen et al. 2009), que está modificado levemente del planteado por otros previamente (Kuznetsov et al. 2008). En resumen, la función mitocondrial es evaluada en fibras musculares permeabilizada en saponina usando una secuencia de sustratos añadidos e inhibidores, para evaluar la capacidad respiratoria en los diferentes pasos de la cadena respiratoria mitocondrial. La respiración mitocondrial sólo fue medida en músculo de las extremidades inferiores, por muestra limitada del músculo de los brazos.

#### **4.9. Muestras de sangre**

##### ***4.9.1. 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. 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 a -80 °C hasta su análisis. La concentración de hormonas en suero se determinó por medio de la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que 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, Biotek 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, interleukina-8 y adiponectin, Diagnostic Systems Laboratories (Webster, Tex., USA) para testosterona libre, Insulin RIA100, Pharmacia, (Uppsala, Sweden) para la medición a través de radioinmunoensayo de Insulina. 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, 3.9% para adiponectina, y 3.2 % para interleukina-8.

También se midieron las concentraciones plasmáticas de glucosa a través de un analizador automático (Hitachi, 612 Automatic Analyzer, Roche, Switzerland); el NEFA plasmático fue medido usando un kit Wako NEFA-C (Wako Chemical, Neuss, Germany); y la hemoglobina fue analizada a través de un analizador Bayer DCA 2000+ (Bayer Healthcare, Elkhart, IN, USA).

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

El ADN fue aislado y purificado a partir de 200µl 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 (Rodríguez et al. 2006). Uno de los primers fue marcado con FAMO o VIC. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25µl usando 50ng de ADN genómico, 200 µM 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 µM (para CAG) y 1'5 µM (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 30 ciclos 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 estándar 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.

#### **4.10. Consentimientos y aprobación ética**

Todos los sujetos analizados en los estudios 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. 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 ULPGC y del Comité de Ética de Copenhague (KF 01 304792).

#### **4.11. 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 y Shapiro-Wilk, cuando fue necesario, el análisis estadístico fue realizado con los datos transformados logarítmicamente. Las diferencias entre sujetos de grupos diferentes se establecieron mediante la prueba ANOVA para medidas repetidas, analizando también los cambios en función del tiempo, género, edad, talla, masa total libre de grasa y  $VO_{2max}$ . Las diferencias entre los polimorfismos cortos y largos en el estudio II se realizaron mediante el test t-Student. Los efectos longitudinales, y los cambios entre el inicio y el final del estudio III se establecieron mediante la prueba ANOVA para medidas repetidas, analizando también los cambios en función del tiempo pasado entre las dos medidas, grasa corporal al inicio, edad, talla, masa total libre de grasa, oxidación de grasa a nivel basal, MFO y  $VO_{2max}$ . También se utilizó en el estudio III un análisis de regresión múltiple para determinar qué variables tenían el mayor valor predictivo para MFO. Además, se examinó la existencia de relaciones lineales



ente variables usando el test de correlación de Pearson. Las correlaciones del polimorfismo con masa grasa y leptina fueron ajustadas por testosterona libre, osteocalcina y  $VO_{2max}$  en el estudio II.

La influencia de la longitud de las repeticiones del polimorfismo CAG y GGN en la composición corporal, MFO, hormonas y variables de condición física fue determinada tomando los polimorfismos como variables continuas o dicotómicas mediante límites alélicos correspondientes a la mediana de las distribuciones de las longitudes de CAG y GGN.

Estudio II: 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). 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  $\leq 21$  en hombres y  $\leq 22$  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 tuvieron un número de repeticiones  $\leq 23$  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  $CAG_S+CGN_S$ .

Estudio III: este estudio se realizó con los sujetos pertenecientes al primer (números extremos de repeticiones cortas) y cuarto (números extremos de repeticiones largas) cuartil, de entre los incluidos en el estudio II. Por lo que los sujetos seleccionados por cada grupo tuvieron números de repeticiones de CAG y GGN:  $CAG_S$  (cortos  $\leq 19$  repeticiones),  $CAG_L$  (largos  $\geq 24$  repeticiones),  $GGN_S$  (cortos  $\leq 22$  repeticiones), y  $GGN_L$  (largos  $\geq 25$  repeticiones).

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

# **RESULTADOS**





## 5. Resultados

En el siguiente apartado se resumen los resultados más relevantes de cada uno de los artículos. La descripción detallada de los resultados se encuentra en las publicaciones anexas que forman parte de esta tesis doctoral.

### 5.1. Resumen de los resultados del artículo I (Ara et al. 2010)

*Ara I, Larsen S, Stallknecht B, Guerra B, Morales-Alamo D, Andersen JL, Ponce-Gonzalez JG, Guadalupe-Grau A, Galbo H, Calbet JA, Helge JW. (2010).*

Normal mitochondrial function and increased fat oxidation capacity in leg and arm muscles in obese humans. *Int J Obes (Lond).*

#### **Composición corporal, $VO_{2max}$ y tipo de fibra muscular**

La edad, talla, masa magra total,  $VO_{2max}$  y los tipos de fibras (tipo I, IIA y IIX) fueron similares en los tres grupos, tanto en brazos como en piernas (Ver tabla 1 y 2 del estudio I). Además, no hubo diferencias en área y capilarización de las fibras musculares de los brazos y de las piernas (Ver tabla 2 del estudio I). De acuerdo con el diseño del estudio, los obesos tuvieron mayor peso corporal, grasa corporal y IMC que los otros grupos ( $p < 0.05$ ); sin embargo, el IMC fue similar entre post-obesos y controles (Ver tabla 1).

#### **Tolerancia a la glucosa, ácidos grasos libres y hormonas**

La tolerancia a la glucosa fue menor en obesos que en controles y post-obesos, tanto antes como después del test de tolerancia a la glucosa oral ( $p < 0.05$ ). A su vez, la glucosa, NEFA y la insulina plasmática medidas en ayunas y en reposo fueron mayores en obesos que en los otros dos grupos ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones de leptina plasmática fue mayor en los obesos comparados con controles y post-obesos ( $p < 0.05$ ) (Ver figura 1a del estudio I), mientras que la adiponectina fue mayor en post-obesos que en controles y obesos ( $p < 0.05$ ) (Ver figura 1b del estudio I). No hubo diferencias significativas entre grupos en la hormona de interleukina-8.



### **Oxidación máxima de grasas durante el ejercicio de piernas y brazos**

El valor de MFO durante el ejercicio de piernas fue mayor y ocurrió a una mayor intensidad relativa (FatMax) en obesos y post-obesos que en controles ( $p < 0.05$ ) (Ver figura 2a del estudio I). A su vez, el MFO durante el ejercicio de brazos fue mayor en obesos que en controles ( $p < 0.05$ ), mientras que se encontró una tendencia ( $p = 0.08$ ) con valores mayores en obesos comparados con post-obesos. El FatMax de los brazos en intensidad relativa fue mayor en obesos que en post-obesos y controles ( $p < 0.05$ ).

### **Actividad de enzimas mitocondriales y respiración mitocondrial**

La actividad de CS fue similar entre grupos en el músculo vasto lateral de la pierna. Sin embargo, la actividad de CS fue menor en obesos que en post-obesos y controles en el músculo deltoides del brazo ( $p < 0.05$ ) (Ver tabla 2 del estudio I). En los tres grupos, la actividad de CS fue menor en los músculos del brazo que de la pierna ( $p < 0.05$ ) (Ver tabla 2 del estudio I).

No se encontraron diferencias significativas entre grupos en la actividad de HAD, sin embargo, en obesos y controles demostraron tener menos actividad de HAD en el brazo que en la pierna ( $p < 0.05$ ) (Ver tabla 2 del estudio I).

Los tres grupos obtuvieron valores similares de la actividad de LHS en el vasto lateral (Ver tabla 2 del estudio I). Los depósitos de glucógeno muscular fueron similares tanto en brazos como en piernas en los tres grupos (Ver tabla 2 del estudio I). Sin embargo, los depósitos de TGIM en el vasto lateral fueron mayores en obesos que en controles, y en el deltoides fue mayor en obesos comparados con los otros dos grupos ( $p < 0.05$ ) (Ver tabla 2 del estudio I).

El flujo de  $O_2$  mitocondrial por mg de tejido muscular no fue diferente entre los tres grupos, incluso tras normalizarla por CS como índice de densidad mitocondrial (Ver figura 3 del estudio I).

### **Fosforilación de AMPK y ACC y expresión proteica de SOCS3**

Los tres grupos obtuvieron valores similares en la fosforilación de AMPK y expresión proteica de SOCS3 a nivel basal (Ver tabla 2 del estudio I). Sin embar-



go, la fosforilación de ACC en el vasto lateral fue menor en obesos que en post-obesos y controles ( $p < 0.05$ ), mientras que en el deltoides fue menor en controles que en obesos ( $p < 0.05$ ) (Ver tabla 2 del estudio I). Además, cuando el músculo deltoides fue comparado con el vasto lateral, el grupo control tuvo valores similares en la expresión proteica de SOCS3 y en la fosforilación de AMPK y ACC; mientras que obesos tuvo valores más bajos en la expresión proteica de SOCS3 y en la fosforilación de AMPK y ACC en el músculo deltoides comparados con el vasto lateral ( $p < 0.05$ ) (Ver tabla 2 del estudio I). Los sujetos post-obesos tuvieron mayores niveles de fosforilación de AMPK y ACC ( $p < 0.05$ ), pero no de expresión proteica de SOCS3 en el deltoides comparado con el vasto lateral (Ver tabla 2 del estudio I).

## 5.2. Resumen de los resultados del artículo II (Ponce-González et al. 2011)

*Jesús Gustavo Ponce-González, Amelia Guadalupe-Grau, Francisco Germán Rodríguez-González, Cecilia Dorado, Hugo Olmedillas, Teresa Fuentes, Lorena Rodríguez-García, Bonifacio Nicolás Díaz-Chico, José A L Calbet. (2011).*

Androgen receptor gene polymorphisms and the fat-bone axis in healthy young men and women. *J Androl. (In press).*

### Efectos del polimorfismo del AR sobre la masa grasa y respuesta hormonal

Tanto en hombre como en mujeres, los grupos CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> tuvieron valores similares en composición corporal y en la concentración plasmáticas de leptina, osteocalcina y testosterona (Ver tabla 1 del estudio II); y a su vez, los grupos GGN<sub>S</sub> y GGN<sub>L</sub> tuvieron valores similares en la concentración plasmática de leptina, osteocalcina y testosterona (Ver tabla 2 del estudio II).

No se encontraron correlaciones del polimorfismo CAG y las variables de composición corporal y hormonas, ni en hombres ni en mujeres. El polimorfismo GGN tampoco tuvo relación con las variables de composición corporal y hormonas en hombres. Sin embargo, en mujeres se encontró una asociación directa entre GGN y el logaritmo del porcentaje de grasa ( $r=0.30$ ,  $p < 0.05$ ); el logaritmo del



porcentaje de grasa en el tronco ( $r=0.28$ ,  $p<0.05$ ); el logaritmo de la concentración sérica de leptina ( $r=0.40$ ,  $p<0.05$ ); y el logaritmo de la concentración sérica de osteocalcina ( $r=0.32$ ,  $p<0.05$ ). Estas correlaciones permanecieron significativas tras hacer los cálculos ajustando por testosterona libre, osteocalcina y  $VO_{2max}$  en mujeres (Ver tabla 3 del estudio II).

En hombres, el logaritmo de testosterona libre se asoció inversamente con la adiposidad y con la concentración sérica de leptina, y positivamente con la concentración sérica de osteocalcina (Ver tabla 4 del estudio II).

La adiposidad, junto con las concentraciones séricas de leptina, testosterona libre y osteocalcina fueron similares cuando se realizaron los cálculos por grupos de haplotipos del polimorfismo del AR, con las combinaciones de alelos:  $CAG_L+GGN_L$ ,  $CAG_S+GGN_S$ ,  $CAG_S+GGN_L$ , y  $CAG_L+GGN_S$ .

### 5.3. Resumen de los resultados del artículo III (Ponce-González et al. 2011)

*Jesús Gustavo Ponce-González, Amelia Guadalupe-Grau, Francisco Germán Rodríguez-González, Cecilia Dorado, Rafael S. de Torres-Peralta, David Morales-Alamo, Lorena Rodríguez-García, Bonifacio Nicolás Díaz-Chico, José A L Calbet. (2011b).*

Androgen receptor gene polymorphisms fat mass accumulation, and maximal fat oxidation capacity. A longitudinal study. *Int J Obes (Lond)*. (En revisión).

#### Parte transversal: efectos del polimorfismo del AR sobre MFO y masa grasa

Los grupos extremos de CAG y GGN tenían valores similares en composición corporal y condición física, incluso tras ajustar por la edad (Ver tabla 1 del estudio III). No existieron diferencias entre grupos de CAG para la tasa metabólica basal, MFO y gasto energético diario. Sin embargo, tras ajustar por la edad y la talla, la grasa acumulada en el tronco ( $p=0.09$ ) y MFO por kg de masa magra de las piernas ( $p=0.06$ ) tendió a ser mayor en  $GGN_S$  comparado con  $GGN_L$  (Ver figura 2 del estudio III).





El número de repeticiones de GGN tendió a ser asociado negativamente con el logaritmo de leptina sérica ( $r=-0.32$ ,  $p=0.07$ ), logaritmo de porcentaje de grasa corporal ( $r=-0.31$ ,  $p=0.08$ ), logaritmo de la masa grasa del tronco ( $r=-0.32$ ,  $p=0.07$ ), y una asociación positiva con MFO por kg de masa magra de las extremidades inferiores por la altura al cuadrado ( $r=0.31$ ,  $p=0.08$ ). Además, se observó una correlación negativa entre los niveles de leptina y osteocalcina plasmáticas ( $r=-0.44$ ,  $p<0.05$ ). La leptina se asoció positivamente con la grasa corporal total ( $r=0.56$ ,  $p<0.01$ ), mientras que la correlación entre la osteocalcina y la grasa corporal total fue negativa ( $r=0.41$ ,  $p<0.05$ ). Asociaciones similares se encontraron entre los niveles séricos de leptina y la osteocalcina, con la masa grasa del tronco ( $r=0.48$ ,  $p<0.01$  y  $r=-0.35$ ,  $p<0.05$ , respectivamente), y con el porcentaje de grasa corporal ( $r=0.63$ ,  $p<0.01$  y  $r=-0.44$ ,  $p<0.05$ , respectivamente). Se observó una correlación negativa entre la testosterona libre y la leptina ( $r=-0.43$ ,  $p<0.05$ ). Por otra parte, la testosterona libre en suero se correlacionó inversamente con el porcentaje de grasa corporal ( $r=-0.45$ ,  $p<0.05$ ).

### **Parte longitudinal: efectos del polimorfismo del AR sobre la acumulación de masa grasa**

Los sujetos pertenecientes a los grupos de CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> acumularon respectivamente  $3.4 \pm 5.1$  y  $2.0 \pm 4.4$  kg de grasa corporal total en un período de  $6.4 \pm 1.0$  años de seguimiento ( $p=NS$ ). A su vez, los sujetos pertenecientes a los grupos de GGN<sub>S</sub> y GGN<sub>L</sub> acumularon respectivamente  $3.2 \pm 4.5$  y  $0.5 \pm 4.3$  kg de grasa corporal total en un período de  $6.9 \pm 1.1$  años de seguimiento ( $p=0.13$ ) (Ver tabla 2 del estudio III). Sin embargo, se encontró una tendencia a una diferencia estadísticamente significativa en la acumulación de masa grasa corporal después de ajustar por el porcentaje inicial de grasa corporal, la altura, y el tiempo transcurrido entre las dos mediciones ( $p=0.08$ ); y también cuando se ajustó por el porcentaje inicial de grasa corporal, estatura, oxidación de grasa a nivel basal, y el tiempo transcurrido entre las dos mediciones ( $p=0.08$ ).

Por otro lado, los sujetos pertenecientes a los grupos de GGN<sub>S</sub> y GGN<sub>L</sub> acumularon respectivamente  $2.0 \pm 2.7$  y  $0.3 \pm 2.9$  kg de grasa en la región del tronco en un período de  $6.9 \pm 1.1$  años de seguimiento ( $p=0.19$ ) (Ver tabla 2



del estudio III). Esta diferencia fue estadísticamente significativa después de considerar el porcentaje inicial de grasa corporal, la altura y el tiempo transcurrido entre las dos mediciones ( $p < 0.05$ ) (Ver figura 2B del estudio III); y también cuando fue ajustado por el porcentaje inicial de grasa corporal, estatura, oxidación de grasas a nivel basal y el tiempo transcurrido entre las dos mediciones ( $p < 0.05$ ). Hubo tendencia a la significación cuando se ajustó por el porcentaje inicial de grasa corporal, la altura, MFO (valores absolutos), y el tiempo transcurrido entre las dos mediciones ( $p = 0.07$ ); y ajustándolo por el porcentaje inicial de grasa corporal, la altura, MFO (por la masa magra de las extremidades inferiores), y el tiempo transcurrido entre las dos mediciones ( $p = 0.08$ ).

# DISCUSIÓN





## 6. Discusión

**Estudio I:** Normal mitochondrial function and increased fat oxidation capacity in leg and arm muscles in obese humans. *Int J Obes (Lond)*.

En contraste con nuestras hipótesis de partida este estudio demuestra que los obesos y post-obesos tienen una mayor capacidad de oxidar grasas durante el ejercicio de piernas (ajustado por  $VO_2$  pico de las extremidades inferiores) comparado con los sujetos controles, y que esta ocurre a una mayor intensidad relativa de ejercicio. A su vez, la capacidad oxidativa de la mitocondria no está afectada en obesos y post-obesos comparados con los sujetos controles.

Estos resultados se encuentran contrariados con los publicados anteriormente, donde se observó que la acumulación de grasas incrementada en obesos podría estar explicada por la menor capacidad de oxidar grasas que tienen comparados con sujetos con sobrepeso y a su vez, éstos con sujetos delgados (Keim et al. 1996) (Mittendorfer et al. 2004) (Perez-Martin et al. 2001). Sin embargo, los grupos de estos estudios no fueron ajustados por tipo de fibra muscular,  $VO_{2max}$  y por masa muscular como en nuestro estudio, tres parámetros que influyen en la oxidación de grasas durante el ejercicio (Helge et al. 1999; Stisen et al. 2006) (Holloszy 1967; Olmedillas et al. 2010; Sahlin et al. 2007).

Varios trabajos han demostrado que existen otros factores que podrían influir en la oxidación de grasa como es la densidad mitocondrial, las actividades enzimáticas de HAD y LHS (función y capacidad mitocondrial), y la actividad de los complejos de la cadena de electrones de la respiración mitocondrial, los cuales podrían estar disminuidos en obesos comparado con sujetos delgados (Bakkman et al. 2010; Colberg et al. 1995; Holloway et al. 2009; Jiang et al. 2003; Lagouge et al. 2006; Menshikova et al. 2007; Raben et al. 1998). Además, parece que la pérdida de peso aguda reduce la respiración mitocondrial (Rabol et al. 2009). Sin embargo, nosotros no encontramos diferencias entre grupos en la actividad enzimática de CS, HAD y LHS, ni una disminución del flujo de oxígeno en ninguno de los pasos de la cadena respiratoria mitocondrial del vasto lateral.



En concordancia, no se encontraron diferencias en los niveles de fosforilación de AMPK y expresión proteica de SOCS3 a nivel basal entre los grupos. Sin embargo, se encontró que la fosforilación de ACC a nivel basal fue menor en los obesos que en post-obesos y controles. Este hecho, podría sugerir que los sujetos que tienen menos fosforilación basal de ACC, podrían estar acumulando mayor cantidad de AG en reposo, al no poder introducirlos en el interior de la mitocondria para oxidarlos por el efecto inhibitorio de ACC en las CPT mitocondriales a través de la producción de Malonyl-CoA (Ruderman et al. 1999), pudiendo aumentar los depósitos de TGIM como ocurre en los obesos (Ver tabla 2 del estudio I).

Este aumento en los depósitos de TGIM podría explicar el aumento en la capacidad de oxidación de grasa que tienen los obesos comparados con los controles durante el ejercicio. En efecto, se ha demostrado que la mayor oxidación de grasa durante el ejercicio en obesos comparado con sujetos delgados fue debido a una mayor oxidación de AG intramusculares, ya que la oxidación de AG plasmáticos fue similar (Goodpaster et al. 2002). En concordancia, se ha demostrado que las mujeres obesas tenían aumentada la oxidación de AG ~25% comparado con mujeres delgadas, usando como fuente principal los TGIM durante el ejercicio (Horowitz and Klein 2000). A su vez, existen evidencias de que las mujeres tienen más grasa corporal que los hombres en términos absolutos y relativos (Clarys et al. 1999; Mittendorfer et al. 2003); y al igual que ocurre con los obesos comparados con controles, las mujeres tienen mayor capacidad de oxidación de grasas que los hombres durante el ejercicio (Blatchford et al. 1985; Carter et al. 2001; Costill et al. 1979; Froberg and Pedersen 1984; Powers et al. 1980; Steffensen et al. 2002).

Los niveles aumentados de leptina sérica encontrado en el grupo obesos comparado con controles, podría estimular la capacidad de oxidación de grasa a través de su receptor en el músculo (Steinberg et al. 2002). Sin embargo, resistencia a esta hormona ha sido documentada junto a una disminución del receptor de leptina OB-R en el músculo esquelético de sujetos obesos comparados con controles (Fuentes et al. 2010). Sin embargo, los niveles de SOCS3 fueron similares



entre grupos en nuestro estudio, proteína relacionada con la inhibición de la señalización por leptina, provocando resistencia a la leptina (Steinberg et al. 2006).

Otro hallazgo importante de este estudio, es que los sujetos post-obesos tienen una mayor capacidad de oxidación de grasas durante el ejercicio de piernas en bicicleta que los controles, a pesar de que tenían similar composición corporal, concentración de TG, función mitocondrial y actividad de CS, HAD y LHS. Este hecho, puede estar causado por mecanismos regulatorios que estén relacionados con los niveles plasmáticos de adiponectina, ya que esta hormona se encuentra un 33% aumentada en post-obesos comparado con controles, a pesar de que tenían valores similares en masa grasa. La adiponectina es una hormona que promueve la oxidación de AG en el músculo e hígado (Yamauchi et al. 2002), pudiendo incrementar la oxidación de grasa en el grupo post-obesos comparado con controles mediante la vía AMPK/ACC durante el ejercicio. Sin embargo, a nivel basal no encontramos diferencias entre grupos en la fosforilación de AMPK, a pesar del mayor nivel de adiponectina plasmática en el grupo post-obesos.

Por otro lado y en concordancia con otros (Olsen et al. 2005; Reynolds et al. 2007; Sacchetti et al. 2005), parece ser que la regulación metabólica de los brazos y piernas son diferentes durante el ejercicio. Nuestros resultados demuestran que las piernas tienen más capacidad de oxidación de grasas que los brazos en todos los grupos, a pesar que la distribución de fibras tipo I fue similar. Sin embargo, nosotros encontramos en los grupos obesos y post-obesos mayores niveles de fosforilación de AMPK y ACC a nivel basal en los brazos que en las piernas.

Por lo tanto parece que la acumulación y el exceso de grasa por parte del grupo obesos no es debido a una discapacidad de oxidar grasas o a una disfunción mitocondrial, pudiendo afectar otros factores como los genéticos en la acumulación de grasa, entre los que se encuentra el polimorfismo del receptor de andrógenos (tema de estudio en los dos artículos siguientes).



***Estudio II:*** Androgen receptor gene polymorphisms and the fat-bone axis in young men and women. *J Androl. (In press)*.

En contraste con nuestra hipótesis, no se observó asociación entre las variaciones de longitud polimórfica del AR y la adiposidad o la concentración de leptina sérica en hombres jóvenes. Por otra parte, esta falta de asociación se mantuvo después de ajustar por la osteocalcina, testosterona libre y la capacidad cardiorespiratoria ( $VO_{2max}$ ). Sin embargo, encontramos una asociación positiva entre la longitud de repetición GGN con la adiposidad y la concentración de leptina sérica en mujeres. Esta asociación fue aún más fuerte después de considerar la osteocalcina, testosterona libre y  $VO_{2max}$  como covariables. Al igual que en los hombres, no se encontró relación entre la longitud de repetición CAG con la adiposidad o la concentración sérica de leptina en las mujeres.

Estos resultados indican, que el polimorfismo del receptor de andrógenos tiene poca o ninguna influencia sobre la masa grasa corporal, o su distribución regional. En contraste, un estudio previo realizado con 106 hombres de Alemania, con una edad media similar (28 años) a nuestros sujetos, encontró que la longitud del polimorfismo CAG se asoció con el porcentaje de grasa corporal (evaluado con bioimpedancia:  $r=0.27$ ) (Zitzmann et al. 2003). Del mismo modo, en un estudio con jóvenes daneses (20-29 años), demostró una asociación estadísticamente significativa entre el número de repeticiones de CAG y el porcentaje de grasa corporal medida por DXA (Nielsen et al. 2010). En este último caso, tampoco se encontró asociación entre el número de repeticiones de CAG y la grasa visceral medido mediante resonancia magnética en 393 sujetos (Nielsen et al. 2010). Stanworth y col. (2008) demostraron una asociación positiva del polimorfismo de CAG con los niveles plasmáticos de leptina, el perímetro en la cintura y el índice de masa corporal (IMC) en 232 hombres con diabetes tipo 2 (Stanworth et al. 2008).

Sin embargo y de acuerdo con nuestros resultados, se ha demostrado que no existe asociación entre el número de repeticiones de CAG y el porcentaje de grasa (medido por bioimpedancia) en 170 hombres de Grecia (Goutou et al. 2009). A su vez, tampoco se encontró relación entre el número de repeticiones de CAG y





masa grasa medido por DXA en 159 personas de edad avanzada (75-89 años) (Lapauw et al. 2007). De acuerdo a resultados de estudios previos (Gonzalez Hernandez et al. 2008), nosotros no encontramos en la presente investigación ninguna correlación entre las repeticiones de CAG y la concentración de leptina en ambos sexos. Por lo tanto, parece que las repeticiones del polimorfismo de CAG tienen poca o ninguna influencia sobre el tejido adiposo y la leptina sérica tanto en hombres como en mujeres.

De acuerdo con estudios publicados previamente en hombres (Krithivas et al. 1999; Stiger et al. 2008; Van Pottelbergh et al. 2001), tampoco encontramos una asociación entre la longitud de CAG o GGN con la concentración de testosterona libre en sangre.

A su vez, parece que las repeticiones polimórficas de GGN tienen poca o ninguna relación con la adiposidad o leptina en los hombres de nuestro estudio. Sin embargo, parece que en mujeres existe una fuerte asociación positiva entre el número de repeticiones de GGN con la masa grasa y con la concentración sérica de leptina, la cual no puede ser explicada por diferencias en la concentración de testosterona libre. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que el número de repeticiones de GGN podría estar asociado positivamente con una mayor concentración de testosterona plasmática (Bogaert et al. 2009). Este hecho podría explicar el posible efecto de la testosterona sobre la masa grasa y leptina en las mujeres, ya que al contrario de lo que ocurre en hombres, las mujeres que poseen un alto porcentaje de grasa corporal y leptina plasmática se asocian a una mayor cantidad de testosterona sérica comparadas con mujeres delgadas (Gambineri et al. 2002; Pusalkar et al. 2010).

El hecho de que las mujeres con mayor masa grasa, presenten mayores niveles de andrógenos podría estar relacionado con la hormona de la osteocalcina, ya que se ha descrito un aumento en los niveles de osteocalcina en mujeres obesas comparadas con delgadas (Ostrowska et al. 1998). La osteocalcina parece estimular la producción de testosterona plasmática, actuando sobre las células de Leydig en modelos transgénicos (Oury et al. 2011). En concordancia, nosotros encontramos una asociación entre osteocalcina y testosterona libre en nuestro estudio,



como previamente se había demostrado en otro estudio realizado en mujeres ( $r=57$ ,  $n=23$ ) (Guadalupe-Grau et al. 2009). A su vez, el receptor de andrógenos juega un papel importante en los niveles de osteocalcina y testosterona, ya que ratones knockout para AR (ARKO) desarrollan osteoporosis y obesidad (Kawano et al. 2003; Tsai et al. 2011). De hecho, nosotros encontramos una asociación positiva entre el número de repeticiones de GGN y los niveles de osteocalcina plasmática.

A su vez, la posible interacción entre el polimorfismo de CAG y GGN con la masa grasa no ha sido estudiado previamente. La combinación  $CAG_S+GGN_S$  se ha asociado a una mayor señalización de andrógenos en otros estudios (Gonzalez Hernandez et al. 2008; Navarro et al. 2002). Sin embargo, nuestros resultados indican la falta de interacción entre el polimorfismo de CAG y GGN con la adiposidad en nuestros sujetos, estudiando todas las posibles combinaciones alélicas.



***Estudio III:*** Androgen receptor gene polymorphisms fat mass accumulation, and maximal fat oxidation capacity. A longitudinal study. *Int J Obes (Lond)*. (En revisión).

Este estudio demuestra que los polimorfismos extremos de CAG (<19 vs >23) en hombres sanos parecen no estar asociados a la masa grasa, su distribución regional, oxidación basal y máxima de grasa, y niveles hormonales de testosterona, leptina y osteocalcina. A su vez, la acumulación de grasa en el estudio longitudinal fue similar entre el grupo CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub>. Estos resultados, concuerdan con otros estudios de sujetos pertenecientes al primer y cuarto cuartil del polimorfismo de CAG (Andersen et al. 2011; Goutou et al. 2009; Zitzmann et al. 2001). Sin embargo, nuestros resultados están en contraste con varios estudios previos, donde ven una asociación entre el número de repeticiones de CAG y el porcentaje de masa grasa (Nielsen et al. 2010; Zitzmann et al. 2003). Este hecho podría estar explicado por la influencia del polimorfismo de CAG sobre los niveles de testosterona plasmática, ya que se conoce el efecto inhibitorio de esta hormona sobre la masa grasa (Mauras et al. 1998; Woodhouse et al. 2004).

No obstante, Crabbe y col. encontraron que existe una asociación directa de CAG y testosterona descrita previamente (Crabbe et al. 2007). Además, se encontró una relación lineal positiva entre el número de repeticiones de CAG con los niveles de testosterona y de leptina sérica en hombres con diabetes tipo 2 (Stanworth et al. 2008), por lo que el efecto del polimorfismo del grupo CAG<sub>L</sub> sobre la masa grasa a través de un incrementado nivel de testosterona es contradictorio.

Por otro lado, otros estudios demostraron que no existía asociación entre el polimorfismo de AR y los niveles de testosterona libre (Krithivas et al. 1999) (Stiger et al. 2008), tal y como ocurre en este estudio. De acuerdo con nuestros resultados, no hay asociación entre el número de repeticiones de CAG y la grasa visceral medida mediante resonancia magnética en 393 sujetos (Nielsen et al. 2010). Además, también se ha comunicado que no existe asociación entre la longitud de CAG y los niveles séricos de leptina (Gonzalez Hernandez et al. 2008; Lenz et al. 2011). Por lo tanto, en hombres jóvenes, el número de repeticio-



nes de CAG tiene poco o ningún impacto en la adiposidad, con pequeñas diferencias entre los países, lo que podría deberse a diferencias genéticas y ambientales.

Por otro lado, en contraste con nuestra hipótesis de partida, los polimorfismos extremos de GGN (<22 vs >24) parecen influir en la masa grasa y su distribución regional en hombres sanos. Nuestros resultados demuestran que el grupo GGN<sub>L</sub> presentó menos masa grasa en todo el cuerpo y en la región abdominal comparado con el grupo GGN<sub>S</sub>. A su vez, el grupo GGN<sub>L</sub> demostraba una tendencia a tener una mayor capacidad de oxidación de grasa que el grupo GGN<sub>S</sub>. Estos efectos se confirmaron con los resultados longitudinales, ya que el grupo GGN<sub>L</sub> mostró una menor acumulación de grasa corporal que el GGN<sub>S</sub> a lo largo de los años (~7 años). Este efecto, no había sido estudiado con anterioridad.

Nuestros datos indican que el grupo GGN<sub>L</sub> tienen menos acumulación de tejido adiposo a lo largo de los años, explicado por el aumento en la oxidación de grasas por kg de masa magra de las piernas en este grupo, obteniendo una correlación negativa entre GGN y porcentaje de grasa, MFO por kg de masa magra de las piernas y logaritmo de grasa en el tronco. Este hecho, se relaciona con el encontrado en el *Estudio II* de esta tesis, donde encontramos una asociación negativa entre GGN y masa grasa sólo en mujeres. Este hecho, confirma un dimorfismo sexual en la acción de este polimorfismo del AR sobre la masa grasa, pudiendo estar explicado por los diferentes efectos que tiene los niveles de testosterona en hombres y mujeres, ya que el polimorfismo de GGN se asocia positivamente con la testosterona plasmática (Bogaert et al. 2009). En concordancia, nosotros encontramos valores aumentados en el grupo GGN<sub>L</sub> comparado con GGN<sub>S</sub>, pero que no alcanzaron significación estadística, por lo que no podemos excluir un error de tipo II.

A diferencia del *estudio II*, aquí encontramos efectos del polimorfismo de GGN sobre la masa grasa en hombres. Esto puede ser debido a que en este estudio tratamos con sujetos de casos extremos del polimorfismo del receptor de andrógenos (del primer y cuarto cuartil), lo que facilita poner de manifiesto posibles diferencias. Sin embargo, en el *estudio II* se pudo observar esta influencia del



GGN sobre la masa grasa en las mujeres, sin necesidad de tratar los datos por cuartiles.

A su vez, en concordancia con nuestros resultados, ha sido descrito que el factor principal que puede influir sobre la capacidad máxima de oxidar grasas es el  $VO_{2max}$  (Nordby et al. 2006). Los cambios producidos con el paso del tiempo en el  $VO_{2max}$  de los datos longitudinales de este estudio, se asociaron con la oxidación máxima de grasas. Este hecho indica que una mejora en  $VO_{2max}$  podría producir un incremento en la capacidad de oxidar grasas y por tanto una reducción de grasa corporal y de grasa del tronco. Sin embargo, las diferencias encontradas en  $VO_{2max}$  no explicó la asociación encontrada entre el número de repeticiones de GGN y la acumulación de tejido adiposo. Este hecho, nos indica que el polimorfismo de GGN tiene una influencia directa sobre las diferencias encontradas en masa grasa.



**CONCLUSIONES**  
**(CONCLUSIONS)**







## 7. Conclusiones

- 1) Los sujetos obesos muestran una mayor capacidad de oxidación de grasa durante el ejercicio de piernas y brazos comparados con sujetos controles.
- 2) Los sujetos post-obesos tienen una mayor capacidad de oxidación de grasa sólo durante el ejercicio de piernas comparado con sujetos controles, a pesar de la pérdida de peso.
- 3) La función y la capacidad de oxidación mitocondrial no se encuentra atenuadas en sujetos obesos y post-obesos comparados con controles en el músculo vasto lateral de la pierna, pero sí en el deltoides de obesos comparado con post-obesos y controles.
- 4) La capacidad máxima de oxidación de grasas de las piernas es superior a la capacidad máxima de oxidación de grasas de los brazos.
- 5) La fosforilación basal de ACC se encuentra reducida en el vasto lateral de los obesos comparado con los post-obesos y controles, pudiendo ser una de las causas del aumento de la masa grasa corporal en los obesos.
- 6) El polimorfismo CAG del gen del receptor de andrógenos parece no influir en la masa grasa, en su distribución regional, en su acumulación a lo largo de los años y en la capacidad máxima de oxidar grasas ni en hombres ni en mujeres jóvenes.
- 7) El polimorfismo GGN del gen del receptor de andrógenos está relacionado positivamente con la adiposidad y con la leptina y osteocalcina plasmática en mujeres jóvenes.
- 8) Los sujetos varones con casos extremos largos del polimorfismo GGN del receptor de andrógenos (4º cuartil) acumulan menos grasa con el paso de los años, especialmente en la masa grasa del tronco, debido en parte a su mayor capacidad de oxidar grasas.



## Conclusions

- 1) Obese subjects have greater fat oxidation capacity during arm and leg exercise compared with control subjects.
- 2) Compared with control subjects, the postobese subjects have greater fat oxidation capacity during leg exercise.
- 3) Mitochondrial oxidative function and capacity is not reduced in postobese and obese compared with control subjects in the musculus vastus lateralis, but it is attenuated in the deltoid muscle of obese compared with postobese and control subjects.
- 4) The maximal fat oxidation capacity is greater in the leg than in the arms.
- 5) Basal ACC phosphorylation in the vastus lateralis is reduced in obese compared with postobese and control subjects. This fact could explain the increased whole body fat accumulation in obese group.
- 6) The CAG polymorphism of androgen receptor gene does not appear to have an influence on fat mass, its regional distribution and the maximal capacity to oxidize fat in either men or young women.
- 7) The GGN polymorphism of the androgen receptor gene is positively associated with adiposity and plasma leptin and osteocalcin in young women.
- 8) Men with extreme long GGN polymorphisms of the androgen receptor (4th quartile) accumulate less fat over the years, especially in trunk region, due in part to its greater capacity to oxidize fat.

# **BIBLIOGRAFÍA**





## 8. Bibliografía

Aagaard P, Andersen JL, Bennekou M, Larsson B, Olesen JL, Crameri R, Magnusson SP, Kjaer M (2011) Effects of resistance training on endurance capacity and muscle fiber composition in young top-level cyclists. *Scand J Med Sci Sports*

Abumrad N, Coburn C, Ibrahim A (1999) Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta* 1441: 4-13

Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE (2002) Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. *Med Sci Sports Exerc* 34: 92-97

Achten J, Venables MC, Jeukendrup AE (2003) Fat oxidation rates are higher during running compared with cycling over a wide range of intensities. *Metabolism* 52: 747-752

Ahima RS, Flier JS (2000) Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-437

Ahn KH, Lee SH, Park HT, Kim T, Hur JY, Kim YT, Kim SH (2010) Effect of adiponectin and sex steroid hormones on bone mineral density and bone formation markers in postmenopausal women with subclinical hyperthyroidism. *J Obstet Gynaecol Res* 36: 370-376

Akerman F, Lei ZM, Rao CV (2002) Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol* 16: 299-306

Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR (2006) LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem* 75: 137-163

Andersen JL, Aagaard P (2000) Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 23: 1095-1104

Andersen JL, Schjerling P, Andersen LL, Dela F (2003) Resistance training and insulin action in humans: effects of de-training. *J Physiol* 551: 1049-1058

Andersen ML, Guindalini C, Santos-Silva R, Bittencourt LR, Tufik S (2011) Androgen Receptor CAG Repeat Polymorphism Is Not Associated With Erectile Dysfunction Complaints, Gonadal Steroids, and Sleep Parameters: Data From a Population-Based Survey. *J Androl* 32: 524-529

Andersen P, Henriksson J (1977) Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. *Acta Physiol Scand* 99: 123-125

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

Argiles JM, Lopez-Soriano J, Almendro V, Busquets S, Lopez-Soriano FJ (2005) Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev* 25: 49-65



Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-793

Bakkman L, Fernstrom M, Loogna P, Rooyackers O, Brandt L, Lagerros YT (2010) Reduced respiratory capacity in muscle mitochondria of obese subjects. *Obes Facts* 3: 371-375

Ballor DL, Keeseey RE (1991) A meta-analysis of the factors affecting exercise-induced changes in body mass, fat mass and fat-free mass in males and females. *Int J Obes* 15: 717-726

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

Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM (2006) Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* 55: 2277-2285

Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275: 14563-14572

Banks WA (2004) The many lives of leptin. *Peptides* 25: 331-338

Baratta M (2002) Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit* 8: RA282-292

Barnes BR, Marklund S, Steiler TL, Walter M, Hjalml G, Amarger V, Mahlapuu M, Leng Y, Johansson C, Galuska D, Lindgren K, Abrink M, Stapleton D, Zierath JR, Andersson L (2004) The 5'-AMP-activated protein kinase gamma3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem* 279: 38441-38447

Bassingthwaighte JB, Noodleman L, van der Vusse G, Glatz JF (1989) Modeling of palmitate transport in the heart. *Mol Cell Biochem* 88: 51-58

Behre HM, Simoni M, Nieschlag E (1997) Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47: 237-240

Bell CG, Walley AJ, Froguel P (2005) The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet* 6: 221-234

Berti L, Gammeltoft S (1999) Leptin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells by activation of ERK2. *Mol Cell Endocrinol* 157: 121-130

Bhasin S, Storer TW, Berman N, Yarasheski KE, Clevenger B, Phillips J, Lee WP, Bunnell TJ, Casaburi R (1997) Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 407-413



- Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW (2001) Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol* 170: 27-38
- Bjorbaek C, Kahn BB (2004) Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59: 305-331
- Blaak EE, van Baak MA, Saris WH (1999) Beta-adrenergically stimulated fat oxidation is diminished in middle-aged compared to young subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3764-3769
- Blair SN, Jackson AS (2001) Physical fitness and activity as separate heart disease risk factors: a meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc* 33: 762-764
- Blatchford FK, Knowlton RG, Schneider DA (1985) Plasma FFA responses to prolonged walking in untrained men and women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 53: 343-347
- Bogaert V, Vanbillemont G, Taes Y, De Bacquer D, Deschepper E, Van Steen K, Kaufman JM (2009) Small effect of the androgen receptor gene GGN repeat polymorphism on serum testosterone levels in healthy men. *Eur J Endocrinol* 161: 171-177
- Borodulin K, Laatikainen T, Lahti-Koski M, Lakka TA, Laukkanen R, Sarna S, Jousilahti P (2005) Associations between estimated aerobic fitness and cardiovascular risk factors in adults with different levels of abdominal obesity. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 12: 126-131
- Braun JE, Severson DL (1992) Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287 ( Pt 2): 337-347
- Bray GA (1987) Obesity--a disease of nutrient or energy balance? *Nutr Rev* 45: 33-43
- Brinkmann JF, Abumrad NA, Ibrahim A, van der Vusse GJ, Glatz JF (2002) New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36. *Biochem J* 367: 561-570
- Broberg S, Sahlin K (1989) Adenine nucleotide degradation in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Appl Physiol* 67: 116-122
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* 18: 670-672
- Brouns F, Saris WH, Beckers E, Adlercreutz H, van der Vusse GJ, Keizer HA, Kuipers H, Menheere P, Wagenmakers AJ, ten Hoor F (1989) Metabolic changes induced by sustained exhaustive cycling and diet manipulation. *Int J Sports Med* 10 Suppl 1: S49-62
- Bulow J, Madsen J, Astrup A, Christensen NJ (1985) Vasoconstrictor effect of high FFA/albumin ratios in adipose tissue in vivo. *Acta Physiol Scand* 125: 661-667
- 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. *J Natl Cancer Inst* 91: 339-346



- Calbet JA, Chavarren J, Dorado C (1997) Fractional use of anaerobic capacity during a 30- and a 45-s Wingate test. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 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
- Calles-Escandon J, Sweet L, Ljungqvist O, Hirshman MF (1996) The membrane-associated 40 KD fatty acid binding protein (Berk's protein), a putative fatty acid transporter is present in human skeletal muscle. *Life Sci* 58: 19-28
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549
- Carling D, Zammit VA, Hardie DG (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223: 217-222
- Carlson CA, Kim KH (1973) Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248: 378-380
- Carter J, Jeukendrup AE (2002) Validity and reliability of three commercially available breath-by-breath respiratory systems. *Eur J Appl Physiol* 86: 435-441
- Carter SL, Rennie C, Tarnopolsky MA (2001) Substrate utilization during endurance exercise in men and women after endurance training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E898-907
- Ceddia RB, William WN, Jr., Curi R (2001) The response of skeletal muscle to leptin. *Front Biosci* 6: D90-97
- Clarys JP, Martin AD, Marfell-Jones MJ, Janssens V, Caboer D, Drinkwater DT (1999) Human body composition: A review of adult dissection data. *Am J Hum Biol* 11: 167-174
- Coe NR, Bernlohr DA (1998) Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1391: 287-306
- Coggan AR, Swanson SC, Mendenhall LA, Habash DL, Kien CL (1995) Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am J Physiol* 268: E375-383
- Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, Mombaerts P, Friedman JM (2001) Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest* 108: 1113-1121
- Colberg SR, Simoneau JA, Thaete FL, Kelley DE (1995) Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J Clin Invest* 95: 1846-1853
- Comuzzie AG, Allison DB (1998) The search for human obesity genes. *Science* 280: 1374-1377





Considine RV, Caro JF (1997) Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1255-1272

Consolazio CF, Johnson RE, Pecora LJ (1963) Physiological measurements of metabolic functions in man. Nueva York: McGraw-Hill: 313-339

Coppack SW, Jensen MD, Miles JM (1994) In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res* 35: 177-193

Costill DL, Fink WJ, Getchell LH, Ivy JL, Witzmann FA (1979) Lipid metabolism in skeletal muscle of endurance-trained males and females. *J Appl Physiol* 47: 787-791

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. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3604-3610

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 Res* 22: 3181-3186

Chang CL, Cai JJ, Cheng PJ, Chueh HY, Hsu SY (2011) Identification of metabolic modifiers that underlie phenotypic variations in energy-balance regulation. *Diabetes* 60: 726-734

Christensen EH, Hansen O (1939) Arbeitsfähigkeit und Ernährung. *Scand Arch Physiol* 81: 160-171

Chua SC, Jr., Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL (1997) Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics* 45: 264-270

Chua SC, Jr., White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada N, Kershaw EE, Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Tartaglia LA, Leibel RL (1996) Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes* 45: 1141-1143

Dagenais GR, Tancredi RG, Zierler KL (1976) Free fatty acid oxidation by forearm muscle at rest, and evidence for an intramuscular lipid pool in the human forearm. *J Clin Invest* 58: 421-431

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. *Prostate* 62: 133-139

Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, Hirsch D, Watson N, Gimeno RE, Stahl A (2006) Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* 130: 1245-1258

Doege H, Stahl A (2006) Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 21: 259-268



- Donnelly JE, Smith BK (2005) Is exercise effective for weight loss with ad libitum diet? Energy balance, compensation, and gender differences. *Exerc Sport Sci Rev* 33: 169-174
- Duan C, Winder WW (1992) Nerve stimulation decreases malonyl-CoA in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 72: 901-904
- Dulloo AG, Stock MJ, Solinas G, Boss O, Montani JP, Seydoux J (2002) Leptin directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle. *FEBS Lett* 515: 109-113
- Edwards HT, Margaria R, Dill DB (1934) Metabolic rate, blood sugar and the utilization of carbohydrate. *Am J Physiol* 108: 203-209
- Elmqvist JK, Elias CF, Saper CB (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232
- Essen-Gustavsson B, Tesch PA (1990) Glycogen and triglyceride utilization in relation to muscle metabolic characteristics in men performing heavy-resistance exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 61: 5-10
- Essen B (1977) Intramuscular substrate utilization during prolonged exercise. *Ann N Y Acad Sci* 301: 30-44
- 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. *Mol Cell Endocrinol* 61: 257-262
- Fain JN, Garcija-Sainz JA (1983) Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J Lipid Res* 24: 945-966
- Ferrannini E (1988) The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 37: 287-301
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P (2008) 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
- Fitts RH (1994) Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev* 74: 49-94
- Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 92: 437-440
- Frayn KN (1983) Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol* 55: 628-634
- Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770
- Froberg K, Pedersen PK (1984) Sex differences in endurance capacity and metabolic response to prolonged, heavy exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 52: 446-450
- Froberg SO (1971) Effect of acute exercise on tissue lipids in rats. *Metabolism* 20: 714-720



Froberg SO, Hultman E, Nilsson LH (1975) Effect of noradrenaline on triglyceride and glycogen concentrations in liver and muscle from man. *Metabolism* 24: 119-126

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

Fruhbeck G (2002) Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutr Rev* 60: S47-55; discussion S68-84, 85-47

Fruhbeck G (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393: 7-20

Fruhbeck G, Jebb SA, Prentice AM (1998) Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 18: 399-419

Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, Helge JW, Calbet JA, Guerra B (2010) Leptin receptor 170 kDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. *Exp Physiol* 95: 160-171

Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, Smith JT, Habinowski SA, Kaijser L, Mu J, Ljungqvist O, Birnbaum MJ, Witters LA, Thorell A, Goodyear LJ (2000) Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 1150-1155

Galster AD, Clutter WE, Cryer PE, Collins JA, Bier DM (1981) Epinephrine plasma thresholds for lipolytic effects in man: measurements of fatty acid transport with [<sup>13</sup>C]palmitic acid. *J Clin Invest* 67: 1729-1738

Gallagher D, Kuznia P, Heshka S, Albu J, Heymsfield SB, Goodpaster B, Visser M, Harris TB (2005) Adipose tissue in muscle: a novel depot similar in size to visceral adipose tissue. *Am J Clin Nutr* 81: 903-910

Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R (2002) Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 883-896

Gao T, Marcelli M, McPhaul MJ (1996) Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59: 9-20

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3320-3323

Glatz JF, van der Vusse GJ (1988) Lipid terminology: 'free' fatty acid is ambiguous. *Trends Biochem Sci* 13: 167-168

Glatz JF, van der Vusse GJ (1989) Intracellular transport of lipids. *Mol Cell Biochem* 88: 37-44

Gollnick PD, Ianuzzo CD, Williams C, Hill TR (1969) Effect of prolonged, severe exercise on the ultrastructure of human skeletal muscle. *Int Z Angew Physiol* 27: 257-265



- 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
- Gonzalez Hernandez A, Cabrera de Leon A, Dominguez Coello S, Almeida Gonzalez D, Rodriguez Perez MC, Brito Diaz B, Aguirre-Jaime A, Diaz-Chico BN (2008) Serum resistin and polymorphisms of androgen receptor GAGn and GGNn and aromatase TTTAn. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2107-2112
- Goodpaster BH, Wolfe RR, Kelley DE (2002) Effects of obesity on substrate utilization during exercise. *Obes Res* 10: 575-584
- Goutou M, Sakka C, Stakias N, Stefanidis I, Koukoulis GN (2009) AR CAG repeat length is not associated with serum gonadal steroids and lipid levels in healthy men. *Int J Androl* 32: 616-622
- Guadalupe-Grau A, Ara I, Dorado C, Vicente-Rodriguez G, Perez-Gomez J, Cabrero JC, Serrano-Sanchez JA, Santana A, Calbet JA (2010) Osteocalcin as a negative regulator of serum leptin concentration in humans: insight from triathlon competitions. *Eur J Appl Physiol* 110: 635-643
- Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Chavarren J, Dorado C, Santana A, Serrano-Sanchez JA, Calbet JA (2009) Strength training combined with plyometric jumps in adults: sex differences in fat-bone axis adaptations. *J Appl Physiol* 106: 1100-1111
- Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C, Olmedillas H, Fuentes T, Perez-Gomez J, Delgado-Guerra S, Vicente-Rodriguez G, Ara I, Guerra B, Arteaga-Ortiz R, Calbet JA, Diaz-Chico BN (2011) Androgen receptor gene polymorphisms lean mass and performance in young men. *Br J Sports Med* 45: 95-100
- Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, Calbet JA (2008) Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. *PLoS One* 3: e3466
- Guerra B, Guadalupe-Grau A, Fuentes T, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Olmedillas H, Guillen-Salgado J, Santana A, Calbet JA (2010) SIRT1, AMP-activated protein kinase phosphorylation and downstream kinases in response to a single bout of sprint exercise: influence of glucose ingestion. *Eur J Appl Physiol* 109: 731-743
- Guerra B, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Fuentes T, Chapinal E, Fernandez-Perez L, De Pablos-Velasco P, Santana A, Calbet JA (2011) Is sprint exercise a leptin signaling mimetic in human skeletal muscle? *J Appl Physiol*
- Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C, Calbet JA (2007) Leptin receptors in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 1786-1792
- Gustafson DR, Wen MJ, Koppanati BM (2003) Androgen receptor gene repeats and indices of obesity in older adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 75-81



- Hagenfeldt L (1979) Metabolism of free fatty acids and ketone bodies during exercise in normal and diabetic man. *Diabetes* 28 Suppl 1: 66-70
- Hagenfeldt L, Wahren J (1968) Human forearm muscle metabolism during exercise. II. Uptake, release and oxidation of individual FFA and glycerol. *Scand J Clin Lab Invest* 21: 263-276
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546
- Hales CN, Luzio JP, Siddle K (1978) Hormonal control of adipose-tissue lipolysis. *Biochem Soc Symp*: 97-135
- Hargreaves M, Hawley JA, Jeukendrup A (2004) Pre-exercise carbohydrate and fat ingestion: effects on metabolism and performance. *J Sports Sci* 22: 31-38
- Harvey J, Ashford ML (2003) Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* 44: 845-854
- Hashimoto S, Ootani K, Hayashi S, Naito M (2011) Acute Effects of Shortly Pre- Versus Postprandial Aerobic Exercise on Postprandial Lipoprotein Metabolism in Healthy but Sedentary Young Women. *J Atheroscler Thromb*
- Havel RJ, Pernow B, Jones NL (1967) Uptake and release of free fatty acids and other metabolites in the legs of exercising men. *J Appl Physiol* 23: 90-99
- Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, Hardie DG (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2: 28
- Heemers HV, Tindall DJ (2007) Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 28: 778-808
- Helge JW, Ayre K, Chaunchaiyakul S, Hulbert AJ, Kiens B, Storlien LH (1998) Endurance in high-fat-fed rats: effects of carbohydrate content and fatty acid profile. *J Appl Physiol* 85: 1342-1348
- Helge JW, Dela F (2003) Effect of training on muscle triacylglycerol and structural lipids: a relation to insulin sensitivity? *Diabetes* 52: 1881-1887
- Helge JW, Fraser AM, Kriketos AD, Jenkins AB, Calvert GD, Ayre KJ, Storlien LH (1999) Interrelationships between muscle fibre type, substrate oxidation and body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 986-991
- Helge JW, Kiens B (1997) Muscle enzyme activity in humans: role of substrate availability and training. *Am J Physiol* 272: R1620-1624
- Helge JW, Richter EA, Kiens B (1996) Interaction of training and diet on metabolism and endurance during exercise in man. *J Physiol* 492 ( Pt 1): 293-306



- Helge JW, Watt PW, Richter EA, Rennie MJ, Kiens B (2001) Fat utilization during exercise: adaptation to a fat-rich diet increases utilization of plasma fatty acids and very low density lipoprotein-triacylglycerol in humans. *J Physiol* 537: 1009-1020
- Henderson GC, Fattor JA, Horning MA, Faghihnia N, Johnson ML, Mau TL, Luke-Zeitoun M, Brooks GA (2007) Lipolysis and fatty acid metabolism in men and women during the postexercise recovery period. *J Physiol* 584: 963-981
- Hill JO (1998) Genetic and environmental contributions to obesity. *Am J Clin Nutr* 68: 991-992
- Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Myers MG, Jr., Chua SC, Jr., Kim JK, Kaestner KH, Karsenty G (2008) The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J Cell Biol* 183: 1235-1242
- Hodgetts V, Coppack SW, Frayn KN, Hockaday TD (1991) Factors controlling fat mobilization from human subcutaneous adipose tissue during exercise. *J Appl Physiol* 71: 445-451
- Holloszy JO (1967) Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 242: 2278-2282
- Holloway GP, Bonen A, Spriet LL (2009) Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals. *Am J Clin Nutr* 89: 455S-462S
- Hornstra G (1982) Dietary fats, prostanooids and arterial thrombosis. The Hague: Martinus Nijhoff publishers
- Horowitz JF, Klein S (2000) Oxidation of nonplasma fatty acids during exercise is increased in women with abdominal obesity. *J Appl Physiol* 89: 2276-2282
- Horton TJ, Pagliassotti MJ, Hobbs K, Hill JO (1998) Fuel metabolism in men and women during and after long-duration exercise. *J Appl Physiol* 85: 1823-1832
- Houmard JA, Cox JH, MacLean PS, Barakat HA (2000) Effect of short-term exercise training on leptin and insulin action. *Metabolism* 49: 858-861
- Howlett RA, Heigenhauser GJ, Hultman E, Hollidge-Horvat MG, Spriet LL (1999) Effects of dichloroacetate infusion on human skeletal muscle metabolism at the onset of exercise. *Am J Physiol* 277: E18-25
- Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE (2004) Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med* 351: 2694-2703
- Huhtaniemi IT, Pye SR, Limer KL, Thomson W, O'Neill TW, Platt H, Payne D, John SL, Jiang M, Boonen S, Borghs H, Vanderschueren D, Adams JE, Ward KA, Bartfai G, Casanueva F, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Wu FC (2009) Increased estrogen rather than decreased androgen action is associated with longer androgen receptor CAG repeats. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 277-284



- Hurley BF, Nemeth PM, Martin WH, 3rd, Hagberg JM, Dalsky GP, Holloszy JO (1986) Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. *J Appl Physiol* 60: 562-567
- Inoue K, Yamasaki S, Fushiki T, Okada Y, Sugimoto E (1994) Androgen receptor antagonist suppresses exercise-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69: 88-91
- Issekutz B, Jr., Bortz WM, Miller HI, Paul P (1967) Turnover rate of plasma FFA in humans and in dogs. *Metabolism* 16: 1001-1009
- 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
- Jansson E (1980) Diet and muscle metabolism in man with reference to fat and carbohydrate utilization and its regulation. *Acta Physiol Scand Suppl* 487: 1-24
- Jansson E, Kaijser L (1987) Substrate utilization and enzymes in skeletal muscle of extremely endurance-trained men. *J Appl Physiol* 62: 999-1005
- Jensen MD (2003) Fate of fatty acids at rest and during exercise: regulatory mechanisms. *Acta Physiol Scand* 178: 385-390
- Jeukendrup AE, Wallis GA (2005) Measurement of substrate oxidation during exercise by means of gas exchange measurements. *Int J Sports Med* 26 Suppl 1: S28-37
- Jiang WG, Douglas-Jones A, Mansel RE (2003) Expression of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) and the PPARgamma co-activator, PGC-1, in human breast cancer correlates with clinical outcomes. *Int J Cancer* 106: 752-757
- Jump DB, Clarke SD (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 19: 63-90
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25
- Kanaley JA, Mottram CD, Scanlon PD, Jensen MD (1995) Fatty acid kinetic responses to running above or below lactate threshold. *J Appl Physiol* 79: 439-447
- Kawano H, Kawaguchi H, Kato S (2003) [Bone metabolism in androgen receptor-deficient mice]. *Clin Calcium* 13: 1443-1445
- 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 neuronopathies. *Hum Mol Genet* 4: 523-527
- Keim NL, Belko AZ, Barbieri TF (1996) Body fat percentage and gender: associations with exercise energy expenditure, substrate utilization, and mechanical work efficiency. *Int J Sport Nutr* 6: 356-369



- Kiens B, Essen-Gustavsson B, Gad P, Lithell H (1987) Lipoprotein lipase activity and intramuscular triglyceride stores after long-term high-fat and high-carbohydrate diets in physically trained men. *Clin Physiol* 7: 1-9
- Kimura M, Tateishi N, Shiota T, Yoshie F, Yamauchi H, Suzuki M, Shibasaki T (2004) Long-term exercise down-regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. *Neuroreport* 15: 713-716
- Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellstrom D (2009) Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 24: 785-791
- Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM (2010) Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS One* 5: e11376
- Koivisto V, Hendler R, Nadel E, Felig P (1982) Influence of physical training on the fuel-hormone response to prolonged low intensity exercise. *Metabolism* 31: 192-197
- 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
- Krogh A, Lindhard J (1920) The Relative Value of Fat and Carbohydrate as Sources of Muscular Energy: With Appendices on the Correlation between Standard Metabolism and the Respiratory Quotient during Rest and Work. *Biochem J* 14: 290-363
- Kukuvtis A, Georgiou I, Bouba I, Tsirka 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. *Int J Androl* 25: 149-152
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS (2008) Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3: 965-976
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-1122
- Lampidonis AD, Rogdakis E, Voutsinas GE, Stravopodis DJ (2011) The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene* 477: 1-11
- Langfort J, Ploug T, Ihlemann J, Baranczuk E, Donsmark M, Gorski J, Galbo H (2003) Additivity of adrenaline and contractions on hormone-sensitive lipase, but not on glycogen phosphorylase, in rat muscle. *Acta Physiol Scand* 178: 51-60





Lapauw B, Goemaere S, Crabbe P, Kaufman JM, Ruige JB (2007) Is the effect of testosterone on body composition modulated by the androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in elderly men? *Eur J Endocrinol* 156: 395-401

Larsen S, Ara I, Rabøl R, Andersen JL, Boushel R, Dela F, Helge JW (2009) Are substrate use during exercise and mitochondrial respiratory capacity decreased in arm and leg muscle in type 2 diabetes? *Diabetologia* 52: 1400-1408

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635

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, Karsenty G (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456-469

Lenz B, Heberlein A, Weinland C, Frieling H, Kornhuber J, Bleich S, Hillemacher T (2011) Androgen receptor polyglutamine length does not influence serum levels of adipocytokines in alcoholism: a preliminary retrospective analysis. *Alcohol Alcohol* 46: 214-216

Lin HY, Xu Q, Yeh S, Wang RS, Sparks JD, Chang C (2005) Insulin and leptin resistance with hyperleptinemia in mice lacking androgen receptor. *Diabetes* 54: 1717-1725

Liu ZQ, Mo W, Huang Q, Zhou HH (2007) Genetic polymorphisms of human beta-adrenergic receptor genes and their association with obesity. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 32: 359-367

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* 240: 327-330

Lundby C, Sander M, van Hall G, Saltin B, Calbet JA (2006) Maximal exercise and muscle oxygen extraction in acclimatizing lowlanders and high altitude natives. *J Physiol* 573: 535-547

Lusk G (1924) Animal calorimetry: analysis of the oxidation of mixtures of carbohydrate and fat. *The Journal of Biological Chemistry* 59: 41-42

Lusk G (1928) *The Elements of the Science of Nutrition*. Philadelphia, London: W B Saunders: 447-486

Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, Lehtonen A, Tilvis R, Tuomilehto J, Koulu M, Huupponen R (1998) Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3243-3246

Lyon MF (1999) X-chromosome inactivation. *Curr Biol* 9: R235-237

Mahlapu M, Johansson C, Lindgren K, Hjalml G, Barnes BR, Krook A, Zierath JR, Andersson L, Marklund S (2004) Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E194-200



- Marin R, Guerra B, Alonso R (2001) The amount of estrogen receptor alpha increases after heat shock in a cholinergic cell line from the basal forebrain. *Neuroscience* 107: 447-454
- Martin WH, 3rd, Dalsky GP, Hurley BF, Matthews DE, Bier DM, Hagberg JM, Rogers MA, King DS, Holloszy JO (1993) Effect of endurance training on plasma free fatty acid turnover and oxidation during exercise. *Am J Physiol* 265: E708-714
- Martinez JA, Kearney JM, Kafatos A, Paquet S, Martinez-Gonzalez MA (1999) Variables independently associated with self-reported obesity in the European Union. *Public Health Nutr* 2: 125-133
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3: 1029-1033
- Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S (2003) Androgen receptor functions from reverse genetic models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 95-99
- Mauras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K, Dokler M, Veldhuis JD, Urban RJ (1998) Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1886-1892
- McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F (1999) Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res* 40: 1371-1383
- McCaffery JM, Franz CE, Jacobson K, Leahey TM, Xian H, Wing RR, Lyons MJ, Kremen WS (2011) Effects of social contact and zygosity on 21-y weight change in male twins. *Am J Clin Nutr* 94: 404-409
- McGilvery (1975) *The use of fuels for muscular work. Metabolic adaptation to prolonged physical exercise.* Basel: Birkhauser Verlag
- McKenna MJ, Heigenhauser GJ, McKelvie RS, Obminski G, MacDougall JD, Jones NL (1997) Enhanced pulmonary and active skeletal muscle gas exchange during intense exercise after sprint training in men. *J Physiol* 501 ( Pt 3): 703-716
- Menshikova EV, Ritov VB, Ferrell RE, Azuma K, Goodpaster BH, Kelley DE (2007) Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity. *J Appl Physiol* 103: 21-27
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-343
- 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. *Prostate* 41: 253-257
- Mittendorfer B, Fields DA, Klein S (2004) Excess body fat in men decreases plasma fatty acid availability and oxidation during endurance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E354-362



- Mittendorfer B, Patterson BW, Klein S (2003) Effect of sex and obesity on basal VLDL-triacylglycerol kinetics. *Am J Clin Nutr* 77: 573-579
- Mittendorfer B, Sidossis LS (2001) Mechanism for the increase in plasma triacylglycerol concentrations after consumption of short-term, high-carbohydrate diets. *Am J Clin Nutr* 73: 892-899
- Miyoshi H, Shulman GI, Peters EJ, Wolfe MH, Elahi D, Wolfe RR (1988) Hormonal control of substrate cycling in humans. *J Clin Invest* 81: 1545-1555
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903-908
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140: 5995-5998
- Muoio DM, Dohm GL, Tapscott EB, Coleman RA (1999) Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice. *Am J Physiol* 276: E913-921
- Muoio DM, Lynis Dohm G (2002) Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16: 653-666
- Nader S, Charles MA, Saad MF, Berkowitz AS, Bogardus C (1993) Serum androgens in hyperinsulinemic Pima Indian and obese Caucasian women and their response to short-term insulin infusion. *J Endocrinol Invest* 16: 403-406
- Navarro D, Luzardo OP, Fernandez L, Chesa N, Diaz-Chico BN (2002) Transition to androgen-independence in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81: 191-201
- Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H (2008) Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92: 272-283
- Nielsen TL, Hagen C, Wraae K, Bathum L, Larsen R, Brixen K, Andersen M (2010) The impact of the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene on muscle and adipose tissues in 20-29-year-old Danish men: Odense Androgen Study. *Eur J Endocrinol* 162: 795-804
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM (2006) Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 295: 1549-1555
- Olmedillas H, Sanchis-Moysi J, Fuentes T, Guadalupe-Grau A, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Santana A, Dorado C, Calbet JA, Guerra B (2010) Muscle hypertrophy and increased expression of leptin receptors in the musculus triceps brachii of the dominant arm in professional tennis players. *Eur J Appl Physiol* 108: 749-758
- Olsen DB, Sacchetti M, Dela F, Ploug T, Saltin B (2005) Glucose clearance is higher in arm than leg muscle in type 2 diabetes. *J Physiol* 565: 555-562



- Oscari LB, Palmer WK (1988) Muscle lipolysis during exercise. An update. *Sports Med* 6: 23-28
- Ostrowska Z, Zwirska-Korczala K, Buntner B, Pardela M, Drozd M (1998) Assessment of bone metabolism in obese women. *Endocr Regul* 32: 177-181
- Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P, Karsenty G (2011) Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144: 796-809
- Pankov Iu A (2010) [Genetic variations in energy balance regulation]. *Biomed Khim* 56: 152-167
- Paul P (1970) FFA metabolism of normal dogs during steady-state exercise at different work loads. *J Appl Physiol* 28: 127-132
- Peeters AV, Beckers S, Verrijken A, Mertens I, Roevens P, Peeters PJ, Van Hul W, Van Gaal LF (2008) Association of SIRT1 gene variation with visceral obesity. *Hum Genet* 124: 431-436
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543
- Perez-Martin A, Dumortier M, Raynaud E, Brun JF, Fedou C, Bringer J, Mercier J (2001) Balance of substrate oxidation during submaximal exercise in lean and obese people. *Diabetes Metab* 27: 466-474
- Peronnet F, Massicotte D (1991) Table of nonprotein respiratory quotient: an update. *Can J Sport Sci* 16: 23-29
- Perusse L, Collier G, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Nadeau A, Zimmet PZ, Bouchard C (1997) Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. *J Appl Physiol* 83: 5-10
- Phillips DI, Caddy S, Ilic V, Fielding BA, Frayn KN, Borthwick AC, Taylor R (1996) Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism* 45: 947-950
- Phinney SD, Bistrian BR, Evans WJ, Gervino E, Blackburn GL (1983) The human metabolic response to chronic ketosis without caloric restriction: preservation of submaximal exercise capability with reduced carbohydrate oxidation. *Metabolism* 32: 769-776
- Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B (2009) Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 827-832
- Ponticos M, Lu QL, Morgan JE, Hardie DG, Partridge TA, Carling D (1998) Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J* 17: 1688-1699



- Potter BJ, Sorrentino D, Berk PD (1989) Mechanisms of cellular uptake of free fatty acids. *Annu Rev Nutr* 9: 253-270
- Powers SK, Riley W, Howley ET (1980) Comparison of fat metabolism between trained men and women during prolonged aerobic work. *Res Q Exerc Sport* 51: 427-431
- Pruett ED (1970) FFA mobilization during and after prolonged severe muscular work in men. *J Appl Physiol* 29: 809-815
- Pusalkar M, Meherji P, Gokral J, Savardekar L, Chinnaraj S, Maitra A (2010) Obesity and polycystic ovary syndrome: association with androgens, leptin and its genotypes. *Gynecol Endocrinol* 26: 874-882
- Qu Z, Andersen JL, Zhou S (1997) Visualisation of capillaries in human skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 107: 169-174
- Raben A, Mygind E, Astrup A (1998) Lower activity of oxidative key enzymes and smaller fiber areas in skeletal muscle of postobese women. *Am J Physiol* 275: E487-494
- Rabol R, Svendsen PF, Skovbro M, Boushel R, Haugaard SB, Schjerling P, Schrauwen P, Hesselink MK, Nilas L, Madsbad S, Dela F (2009) Reduced skeletal muscle mitochondrial respiration and improved glucose metabolism in nondiabetic obese women during a very low calorie dietary intervention leading to rapid weight loss. *Metabolism* 58: 1145-1152
- Rajender S, Singh L, Thangaraj K (2007) Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl* 9: 147-179
- Ramirez ME, McMurry MP, Wiebke GA, Felten KJ, Ren K, Meikle AW, Iverius PH (1997) Evidence for sex steroid inhibition of lipoprotein lipase in men: comparison of abdominal and femoral adipose tissue. *Metabolism* 46: 179-185
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14: 529-644
- Rau H, Reaves BJ, O'Rahilly S, Whitehead JP (1999) Truncated human leptin (delta133) associated with extreme obesity undergoes proteasomal degradation after defective intracellular transport. *Endocrinology* 140: 1718-1723
- Raudrant D, Rabe T (2003) Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs* 63: 463-492
- Reitman J, Baldwin KM, Holloszy JO (1973) Intramuscular triglyceride utilization by red, white, and intermediate skeletal muscle and heart during exhausting exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 142: 628-631
- Reynolds THt, Supiano MA, Dengel DR (2007) Regional differences in glucose clearance: effects of insulin and resistance training on arm and leg glucose clearance in older hypertensive individuals. *J Appl Physiol* 102: 985-991



- Richieri GV, Anel A, Kleinfeld AM (1993) Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 32: 7574-7580
- Richieri GV, Kleinfeld AM (1995) Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res* 36: 229-240
- Riddell MC, Jamnik VK, Iscoe KE, Timmons BW, Gledhill N (2008) Fat oxidation rate and the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation decreases with pubertal status in young male subjects. *J Appl Physiol* 105: 742-748
- Rietjens GJ, Kuipers H, Kester AD, Keizer HA (2001) Validation of a computerized metabolic measurement system (Oxycon-Pro) during low and high intensity exercise. *Int J Sports Med* 22: 291-294
- Robinson J, Newsholme EA (1967) Glycerol kinase activities in rat heart and adipose tissue. *Biochem J* 104: 2C-4C
- Rodriguez-Gonzalez G, Cabrera S, Ramirez-Moreno R, Bilbao C, Diaz-Chico JC, Serra L, Chesa N, Cabrera JJ, Diaz-Chico BN (2009) 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* 113: 85-91
- 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. *Int J Cancer* 118: 1420-1425
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR (1993) Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 265: E380-391
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Zhang XJ, Wolfe RR (1995) Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise. *J Appl Physiol* 79: 1939-1945
- Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY, Chatterjee B (1999) Regulation of androgen action. *Vitam Horm* 55: 309-352
- Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA (1999) Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276: E1-E18
- Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el-Tawil K, Rude RK, Kamdar V (1997) Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 579-584
- Sacchetti M, Olsen DB, Saltin B, van Hall G (2005) Heterogeneity in limb fatty acid kinetics in type 2 diabetes. *Diabetologia* 48: 938-945
- Saha AK, Kurowski TG, Ruderman NB (1995) A malonyl-CoA fuel-sensing mechanism in muscle: effects of insulin, glucose, and denervation. *Am J Physiol* 269: E283-289



Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, Apazidis A, Witters LA, Shafirir E, Ruderman NB (1997) Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am J Physiol* 272: E641-648

Sahlin K, Katz A, Broberg S (1990) Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during prolonged exercise. *Am J Physiol* 259: C834-841

Sahlin K, Mogensen M, Bagger M, Fernstrom M, Pedersen PK (2007) The potential for mitochondrial fat oxidation in human skeletal muscle influences whole body fat oxidation during low-intensity exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E223-230

Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, Green KA, Grahame Hardie D, Ashworth A, Alessi DR (2005) Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J* 24: 1810-1820

Sampath H, Ntambi JM (2005) Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 25: 317-340

Sawchenko PE (1998) Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol* 402: 435-441

Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME, Hesselink MK, Moonen-Kornips E, Schaart G, Mustard KJ, Hardie DG, Saris WH, Nicolay K, Schrauwen P (2005) Intramyocellular lipid content and molecular adaptations in response to a 1-week high-fat diet. *Obes Res* 13: 2088-2094

Schrauwen-Hinderling VB, van Loon LJ, Koopman R, Nicolay K, Saris WH, Kooi ME (2003) Intramyocellular lipid content is increased after exercise in nonexercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 95: 2328-2332

Schrauwen P, Wagenmakers AJ, van Marken Lichtenbelt WD, Saris WH, Westerterp KR (2000) Increase in fat oxidation on a high-fat diet is accompanied by an increase in triglyceride-derived fatty acid oxidation. *Diabetes* 49: 640-646

Schulz H, Helle S, Heck H (1997) The validity of the telemetric system CORTEX X1 in the ventilatory and gas exchange measurement during exercise. *Int J Sports Med* 18: 454-457

Seidman SN (2007) Androgens and the aging male. *Psychopharmacol Bull* 40: 205-218

Sheffield-Moore M (2000) Androgens and the control of skeletal muscle protein synthesis. *Ann Med* 32: 181-186

Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Braga M, Yuan X, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S (2006) Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology* 147: 141-154

Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C, Caro JF (1996) Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 97: 1344-1347



- Skjaerpe PA, Giwercman YL, Giwercman A, Svartberg J (2010) Androgen receptor gene polymorphism and the metabolic syndrome in 60-80 years old Norwegian men. *Int J Androl* 33: 500-506
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
- Smith PM, Doherty M, Price MJ (2006) The effect of crank rate on physiological responses and exercise efficiency using a range of submaximal workloads during arm crank ergometry. *Int J Sports Med* 27: 199-204
- Soderlund K, Greenhaff PL, Hultman E (1992) Energy metabolism in type I and type II human muscle fibres during short term electrical stimulation at different frequencies. *Acta Physiol Scand* 144: 15-22
- Sondergaard E, Rahbek I, Sorensen LP, Christiansen JS, Gormsen LC, Jensen MD, Nielsen S (2011) Effects of exercise on VLDL-triglyceride oxidation and turnover. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E939-944
- Sriwijitkamol A, Ivy JL, Christ-Roberts C, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Musi N (2006) LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E925-932
- Stanworth RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH (2008) Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin in men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 159: 739-746
- Steffensen CH, Roepstorff C, Madsen M, Kiens B (2002) Myocellular triacylglycerol breakdown in females but not in males during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E634-642
- Steinberg GR, Dyck DJ (2000) Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1374-1382
- Steinberg GR, Jorgensen SB (2007) The AMP-activated protein kinase: role in regulation of skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. *Mini Rev Med Chem* 7: 519-526
- Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D, Kemp BE (2006) The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3592-3597
- Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ (2002) Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E187-192
- Steinberg GR, Smith AC, Van Denderen BJ, Chen Z, Murthy S, Campbell DJ, Heigenhauser GJ, Dyck DJ, Kemp BE (2004) AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4575-4580





Stevenson EJ, Astbury NM, Simpson EJ, Taylor MA, Macdonald IA (2009) Fat oxidation during exercise and satiety during recovery are increased following a low-glycemic index breakfast in sedentary women. *J Nutr* 139: 890-897

Stevenson EJ, Williams C, Mash LE, Phillips B, Nute ML (2006) Influence of high-carbohydrate mixed meals with different glycemic indexes on substrate utilization during subsequent exercise in women. *Am J Clin Nutr* 84: 354-360

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* 82: 427-435

Stisen AB, Stougaard O, Langfort J, Helge JW, Sahlin K, Madsen K (2006) Maximal fat oxidation rates in endurance trained and untrained women. *Eur J Appl Physiol* 98: 497-506

Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD (1998) A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18: 213-215

Tanaka T, Hidaka S, Masuzaki H, Yasue S, Minokoshi Y, Ebihara K, Chusho H, Ogawa Y, Toyoda T, Sato K, Miyanaga F, Fujimoto M, Tomita T, Kusakabe T, Kobayashi N, Tanioka H, Hayashi T, Hosoda K, Yoshimatsu H, Sakata T, Nakao K (2005) Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. *Diabetes* 54: 2365-2374

Tarnopolsky LJ, MacDougall JD, Atkinson SA, Tarnopolsky MA, Sutton JR (1990) Gender differences in substrate for endurance exercise. *J Appl Physiol* 68: 302-308

Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093-6096

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271

Terjung RL, Budohoski L, Nazar K, Kobryn A, Kaciuba-Uscilko H (1982) Chylomicron triglyceride metabolism in resting and exercising fed dogs. *J Appl Physiol* 52: 815-820

Thong FS, Hudson R, Ross R, Janssen I, Graham TE (2000) Plasma leptin in moderately obese men: independent effects of weight loss and aerobic exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E307-313

Trump ME, Heigenhauser GJ, Putman CT, Spriet LL (1996) Importance of muscle phosphocreatine during intermittent maximal cycling. *J Appl Physiol* 80: 1574-1580

Tsai MY, Shyr CR, Kang HY, Chang YC, Weng PL, Wang SY, Huang KE, Chang C (2011) The reduced trabecular bone mass of adult ARKO male mice results from the decreased osteogenic differentiation of bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 411: 477-482



- Turner RT, Colvard DS, Spelsberg TC (1990) Estrogen inhibition of periosteal bone formation in rat long bones: down-regulation of gene expression for bone matrix proteins. *Endocrinology* 127: 1346-1351
- 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
- Van Proeyen K, Szulc K, Nielens H, Ramaekers M, Hespel P (2011) Beneficial metabolic adaptations due to endurance exercise training in the fasted state. *J Appl Physiol* 110: 236-245
- Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S (2003) The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111: 91-98
- Wabitsch M, Blum WF, Muehe R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, Hauner H (1997) Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 100: 808-813
- Wagenmakers AJ (1998) Protein and amino acid metabolism in human muscle. *Adv Exp Med Biol* 441: 307-319
- Wahrenberg H, Engfeldt P, Bolinder J, Arner P (1987) Acute adaptation in adrenergic control of lipolysis during physical exercise in humans. *Am J Physiol* 253: E383-390
- 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
- Wauters M, Considine RV, Chagnon M, Mertens I, Rankinen T, Bouchard C, Van Gaal LF (2002) Leptin levels, leptin receptor gene polymorphisms, and energy metabolism in women. *Obes Res* 10: 394-400
- White DW, Tartaglia LA (1996) Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 303-309
- Wilmore JH, Davis JA, Norton AC (1976) An automated system for assessing metabolic and respiratory function during exercise. *J Appl Physiol* 40: 619-624
- Wojtaszewski JF, Birk JB, Frosig C, Holten M, Pilegaard H, Dela F (2005) 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol* 564: 563-573
- Wolfe RR, Klein S, Carraro F, Weber JM (1990) Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am J Physiol* 258: E382-389
- Wolfe RR, Peters EJ (1987) Lipolytic response to glucose infusion in human subjects. *Am J Physiol* 252: E218-223



Wong SL, DePaoli AM, Lee JH, Mantzoros CS (2004) Leptin hormonal kinetics in the fed state: effects of adiposity, age, and gender on endogenous leptin production and clearance rates. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2672-2677

Woodhouse LJ, Gupta N, Bhasin M, Singh AB, Ross R, Phillips J, Bhasin S (2004) Dose-dependent effects of testosterone on regional adipose tissue distribution in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 718-726

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295

Yaspelkis BB, 3rd, Davis JR, Saberi M, Smith TL, Jazayeri R, Singh M, Fernandez V, Trevino B, Chinookoswong N, Wang J, Shi ZQ, Levin N (2001) Leptin administration improves skeletal muscle insulin responsiveness in diet-induced insulin-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E130-142

Yu IC, Lin HY, Liu NC, Wang RS, Sparks JD, Yeh S, Chang C (2008) Hyperleptinemia without obesity in male mice lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology* 149: 2361-2368

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432

Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, von Eckardstein S, von Eckardstein A, Nieschlag E (2001) The CAG repeat polymorphism in the AR gene affects high density lipoprotein cholesterol and arterial vasoreactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4867-4873

Zitzmann M, Gromoll J, von Eckardstein A, Nieschlag E (2003) The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene modulates body fat mass and serum concentrations of leptin and insulin in men. *Diabetologia* 46: 31-39

Zuntz N (1896) Über die Rolle des Zuckers im thierischen Stoffwechsel. *Arch Physiol* 538-577



# **ESTUDIO I**





## ORIGINAL ARTICLE

# Normal mitochondrial function and increased fat oxidation capacity in leg and arm muscles in obese humans

I Ara<sup>1,2,3</sup>, S Larsen<sup>3</sup>, B Stallknecht<sup>3</sup>, B Guerra<sup>4</sup>, D Morales-Alamo<sup>4</sup>, JL Andersen<sup>5</sup>, JG Ponce-González<sup>4</sup>, A Guadalupe-Grau<sup>4</sup>, H Galbo<sup>6</sup>, JAL Calbet<sup>4</sup> and JW Helge<sup>3</sup>

<sup>1</sup>GENUD Toledo Research Group (Growth, Exercise, Nutrition and Development), University of Castilla-La Mancha, Toledo, Spain; <sup>2</sup>Department of Physiatry and Nursing, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences, Center for Healthy Aging, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark; <sup>4</sup>Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Canary Island, Spain; <sup>5</sup>Institute of Sports Medicine Copenhagen, Bispebjerg Hospital, Copenhagen, Denmark and <sup>6</sup>Department of Rheumatology, Rigshospitalet, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

**Aim/hypothesis:** The aim of this study was to investigate mitochondrial function, fibre-type distribution and substrate oxidation during exercise in arm and leg muscles in male postobese (PO), obese (O) and age- and body mass index (BMI)-matched control (C) subjects. The hypothesis of the study was that fat oxidation during exercise might be differentially preserved in leg and arm muscles after weight loss.

**Methods:** Indirect calorimetry was used to calculate fat and carbohydrate oxidation during both progressive arm-cranking and leg-cycling exercises. Muscle biopsy samples were obtained from musculus deltoideus (m. deltoideus) and m. vastus lateralis muscles. Fibre-type composition, enzyme activity and O<sub>2</sub> flux capacity of saponin-permeabilized muscle fibres were measured, the latter by high-resolution respirometry.

**Results:** During the graded exercise tests, peak fat oxidation during leg cycling and the relative workload at which it occurred (FatMax) were higher in PO and O than in C. During arm cranking, peak fat oxidation was higher in O than in C, and FatMax was higher in O than in PO and C. Similar fibre-type composition was found between groups. Plasma adiponectin was higher in PO than in C and O, and plasma leptin was higher in O than in PO and C.

**Conclusions:** In O subjects, maximal fat oxidation during exercise and the eliciting relative exercise intensity are increased. This is associated with higher intramuscular triglyceride levels and higher resting non esterified fatty acid (NEFA) concentrations, but not with differences in fibre-type composition, mitochondrial function or muscle enzyme levels compared with Cs. In PO subjects, the changes in fat oxidation are preserved during leg, but not during arm, exercise.

*International Journal of Obesity* (2011) 35, 99–108; doi:10.1038/ijo.2010.123; published online 15 June 2010

**Keywords:** lipid oxidation; weight loss; adiponectin; physical activity

## Introduction

The prevalence of obesity is increasing worldwide, and most often this is ascribed to unfavorable changes in lifestyle towards an unhealthy diet and an inadequate physical activity level. Decreased physical activity may lead to reduced fat oxidative capacity.<sup>1</sup> In fact, there seems to be a

consensus or almost a paradigm that obesity is accompanied by an impaired ability to oxidize fat during exercise,<sup>2–6</sup> although not all studies demonstrate this.<sup>7,8</sup> In line with this notion, there is evidence that mitochondrial oxidative capacity is decreased in skeletal muscle of O<sup>9</sup> and type 2 diabetic individuals,<sup>10–12</sup> although not all agree.<sup>13</sup>

In sedentary O subjects, a moderate weight loss accompanied by an improved aerobic capacity leads to a normalization of mitochondrial oxidative capacity and insulin resistance.<sup>14</sup> However, when weight loss occurs in the absence of an increase in physical activity level, that is, without improvement in aerobic capacity, insulin resistance is normalized,<sup>2,15</sup> but muscle oxidative capacity remains

Correspondence: Dr I Ara, Faculty of Sport Sciences, Department of Didactica Expresion Musical, Plastica y Corporal, University of Castilla-La Mancha, Avda Carlos III s/n, Toledo 45071, Spain.

E-mail: ignacio.ara@uclm.es

Received 21 December 2009; revised 6 April 2010; accepted 3 May 2010; published online 15 June 2010

unaltered.<sup>5,16</sup> In a previous study, a decreased muscle  $\beta$ -hydroxy-acyl-CoA-dehydrogenase (HAD) activity was observed in postobese (PO) subjects,<sup>17</sup> but it is not known whether the obesity-induced attenuation of fat oxidation and/or mitochondrial oxidative capacity is normalized after persistent long-term weight loss.

In literature, the majority of studies report data on leg muscle, but recent studies have demonstrated higher glucose clearance in arm compared with leg muscle in patients with type 2 diabetes<sup>18</sup> and those with hypertension.<sup>19</sup> Furthermore, there is some evidence of heterogeneity in limb fatty acid (FA) kinetics in patients with type 2 diabetes compared with controls (C),<sup>20</sup> implying that arm muscle may be metabolically different from leg muscle. In a recent study, we demonstrated that maximal fat oxidation (MFO) was lower during exercise with the arms than with the legs in type 2 diabetics and in lean and O controls.<sup>13</sup> However, in O individuals, MFO occurred at similar exercise intensity during leg and arm cycling, whereas in type 2 diabetics and lean Cs, the exercise intensity at MFO was lower during arm exercise.<sup>13</sup>

Thus, in this study, we investigated MFO in male O, PO and matched C subjects during graded ergometer exercise performed either only with the upper body (UB, arm cranking) or only with the lower extremities. In addition, we aimed at determining whether regional metabolic differences could be explained by differences in muscle fibre composition, enzymatic activity of  $\beta$ -hydroxy-acyl-CoA-dehydrogenase and basal AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation or acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylation. The underlying hypothesis was that, in former O subjects, the oxidative capacity in the muscle is not fully normalized after a persistent long-term weight loss.

## Methods

### Subjects

Thirty young male subjects participated in the study. Subjects were fully informed of the nature and the possible risks associated with the study before they volunteered to participate. The study was approved by the Copenhagen Ethics Committee (KF 01 304792) and the experiments conformed to The Declaration of Helsinki.

### Experimental protocol

Initially, subjects were recruited into three groups: PO, obese (O) and control (C). The inclusion criteria for the PO group were as follows: (1) body mass index (BMI) levels lower than  $30 \text{ kg m}^{-2}$ ; (2) weight loss through nonpharmacological or surgical therapies of at least 10% of their body weight (on an average, the weight loss was 26% (range 15–37%)); and (3) weight stability at the time of the study ( $\pm 2 \text{ kg}$  for at least 1 month before the beginning of the experiments). The weight loss of PO subjects had on an average occurred  $6 \pm 1$  years

earlier (range 1–10 years). Intentionally, the three groups were matched by age and, in addition, the C and PO groups were also matched by BMI. However, after recruitment, the groups turned out to have similar height, lean body mass and maximal oxygen uptake ( $\text{VO}_{2\text{max}}$ ), expressed both in absolute terms ( $\text{l min}^{-1}$ ) and relative to lean body mass (litre per kg of LBM per min).

Subjects reported to the laboratory on 3 days over a 3-week period and the order of the experiments performed during the last 2 days was randomized. Subjects were instructed not to engage in vigorous physical activity on the day before each test day and also to consume their normal diet avoiding excess alcohol and tobacco consumption.

On each of the experimental days, subjects presented themselves after fasting overnight and, after 15 min of rest, their height and weight were measured. On the first experimental day, subjects underwent a standard 120-min oral glucose tolerance test, ingesting 75 g of glucose dissolved in 300 ml water. Capillary blood was sampled before and after the oral glucose tolerance test for measurement of plasma glucose concentrations (ABL, series 700; Radiometer, Copenhagen, Denmark). Body composition was determined using dual-energy X-ray absorptiometry scanning using a Lunar Prodigy Advance bone densitometer (Lunar Corporation, Madison, WI, USA). Finally, a graded incremental exercise protocol was used to establish  $\text{VO}_{2\text{max}}$  on a normal cycle ergometer (Ergometrics 800, Jaeger, Würzburg, Germany). Habitual daily physical activity levels were assessed by the short version of the International Physical Activity Questionnaire to which some additional questions on specific exercise habits were added.

On one day, participants rested for 20 min in a supine position and a needle biopsy sample<sup>21</sup> from musculus deltoideus (m. deltoideus) was obtained by suction. Subjects then performed a graded cycle ergometer exercise test to determine MFO, and the intensity at which MFO occurred (FatMax). This test has been described in detail elsewhere.<sup>22</sup>

On another day, participants again rested in a supine position and a needle biopsy sample from m. vastus lateralis was obtained. Subjects then performed a graded arm-crank exercise protocol using an electrically braked arm ergometer (Lode Anglo, Groningen, The Netherlands). The test commenced at 20 Watts for 5 min, followed by 15 Watt increments every 3 min. When subjects reached respiratory exchange ratio  $> 1.0$ , the exercise was stopped at the end of the corresponding 3 min period. Thereafter, subjects rested for 5 min. Subsequently, exercise was started at the last load performed and then increments of 15 Watts were added every minute until voluntary exhaustion. Subjects were instructed to maintain a cranking rate of 60 r.p.m. There is evidence that continuous and discontinuous  $\text{VO}_{2\text{max}}$  protocols using UB will lead to comparable results.<sup>23</sup>

The design of the graded exercise protocol for UB was adapted from the protocol published by Smith *et al.*<sup>24</sup> However, minor changes were incorporated to expand the part of the test where the respiratory exchange ratio was



below 1.0: a lower start workload (20 Watts and not 50 Watts), lower increments (15 Watts and not 20 Watts) and lower crank rate (60 instead of 80 r.p.m.). To elicit stable phases, 3 min instead of 2 min steps were applied in the protocol. After the 5 min resting period, the increased progression in workload in the final maximal part of the test was chosen to facilitate untrained subjects' achievement of UB  $\text{VO}_{2\text{max}}$ .

On one of the two last experimental days, an initial 30 min basal measurement of resting metabolic rate was performed. Rates of  $\text{VO}_2$  and  $\text{VCO}_2$  were measured by an open circuit ventilated hood system (Oxycon Pro; Jaeger, Würzburg, Germany). Thereafter, a venous blood sample was obtained. The same online system was used to measure pulmonary oxygen uptake ( $\text{VO}_2$ ) and carbon dioxide excretion ( $\text{VCO}_2$ ) during UB, as well as normal lower body bicycle exercise on the 2 last experimental days.

#### Analytical procedures

Blood was transferred into tubes containing 0.3 M EDTA (10 mg  $\text{ml}^{-1}$  blood) and immediately centrifuged at 4 °C for 10 min. A small fraction of the blood was transferred into tubes containing ethylene glycol tetraacetic acid, which was later used for determination of insulin concentrations. Plasma was stored at -80 °C until analysis. Plasma insulin was determined using a radioimmunoassay kit (Insulin RIA100, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Plasma glucose was analysed using a conventional commercially available assay on an automated analyser (Hitachi, 612 Automatic Analyzer, Roche, Switzerland). Plasma NEFA was measured using a Wako NEFA-C test kit (Wako Chemical, Neuss, Germany) and the analysis was performed on an automatic analyser (Hitachi, 612 Automatic Analyzer). Blood glycosylated haemoglobin was analysed on a Bayer DCA 2000+ (Bayer Healthcare, Elkhart, IN, USA) using a latex immunoagglutination inhibition method. Plasma adiponectin, leptin and interleukin-8 were measured using specific high-sensitive human ELISA kits. The adiponectin assay (Linco Research, St Charles, MO, USA) had an intra-assay coefficient of variation of 3.9%. The leptin assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) had an intra-assay coefficient of variation of 3.2%. The interleukin-8 assay (R&D Systems) had an intra-assay coefficient of variation of 3.2%.

Muscle biopsy samples were divided into three parts: one part was frozen directly in liquid nitrogen within 15 s after sampling, another part was mounted in a mounting medium and frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen and the last part was put into a BIOPS (see Kutnesove<sup>25</sup>) solution<sup>25</sup> and immediately analysed for mitochondrial function.<sup>13</sup> The first two parts were stored at -80 °C until further analysis.

For histochemical analysis, the mounted part of the biopsy specimens was cut into serial transverse sections (10  $\mu\text{m}$ ) in a cryostat. The sections were stained for myofibrillar ATPase<sup>26</sup> and for muscle capillaries.<sup>27</sup> Subsequently, fibre-type composition, fibre size and capillary density were determined

using a computerized quantification system (Tema Scanbeam, Hadsund, Denmark<sup>28,27</sup>). For each biopsy, an average of  $150 \pm 12$  fibres were analysed. In each biopsy, only a small number of type IC and type IIAX fibres were distinguished, and these were therefore pooled into type IIA and type IIX fibres, respectively.

Before biochemical analysis, the directly frozen parts of the muscle biopsy samples were freeze-dried and dissected free of connective tissue, visible fat and blood using a stereomicroscope. Both in arm and leg muscle samples, the maximal activity of HAD and citrate synthase (CS) was determined fluorometrically as described previously.<sup>29</sup> Hormone-sensitive lipase (HSL) activity was assayed as previously described,<sup>30</sup> but only in leg muscle because of limited availability of arm muscle tissue. The muscle glycogen and triacylglycerol content was measured enzymatically, as described previously.<sup>31</sup>

#### Mitochondrial respiration protocol

We applied a protocol that is a slightly modified version<sup>13</sup> of a detailed description given elsewhere.<sup>25</sup> In brief, mitochondrial function is assessed in saponin-permeabilized muscle fibres using sequential additions of substrates and inhibitors to assess the respiratory capacity of the various steps in the mitochondrial respiratory chain. Mitochondrial respiration analysis was performed only in leg muscle because of limited availability of arm muscle tissue.

#### Western blot analysis

Muscle protein extracts were prepared as described previously<sup>32</sup> and total protein content was quantified using the bicinchoninic acid assay.<sup>33</sup> Equal protein amounts (50  $\mu\text{g}$ ) of each sample were electrophoresed on a 7.5–10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to Hybond-P membranes.<sup>34</sup> To detect suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) protein expression, membranes were incubated with a rabbit polyclonal-specific anti-human SOCS3 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). To control for differences in loading and transfer efficiency across membranes, an antibody directed against  $\alpha$ -tubulin was used to hybridize on the same samples (Biosigma, Madrid, Spain). To detect Thr<sup>172</sup>-phosphorylated-AMPK $\alpha$  and Ser<sup>221</sup>-phosphorylated-ACC $\beta$ , specific polyclonal antibodies directed against the phosphorylated and total forms of these kinases were used (Cell Signaling Technology, Barcelona, Spain). Specific bands were visualized with the ECL chemiluminescence kit, the ChemiDoc XRS system (Bio-Rad Laboratories), and analysed with the image analysis program Quantity one (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK). Data are reported as the band intensity of immunostaining values (arbitrary units) obtained for SOCS3, relative to those obtained for  $\alpha$ -tubulin, or as arbitrary units of band density obtained for the phosphorylated form of AMPK $\alpha$  and ACC $\beta$ , relative to those obtained for the total AMPK $\alpha$  and ACC $\beta$  forms, respectively.

$\alpha$ -Tubulin, total AMPK $\alpha$  and total ACC $\beta$  protein levels were similar in the three groups (data not shown, all  $P > 0.05$ ). Western blot analysis of all proteins studied was performed in triplicate, with a variation coefficient less than 10%.

**Calculations**

Whole-body fat and glucose oxidation were calculated from  $VO_2$  and  $VCO_2$  values during the last 60s of each exercise step in the graded exercise tests, using standard indirect calorimetry equations.<sup>35</sup> It is assumed that protein oxidation is similar and small during exercise in the three groups studied. For each subject, polynomial curve fitting was used to determine whole-body peak fat oxidation. Resting metabolic rate was averaged over a minimum of 5 min. Resting energy expenditure was calculated according to the formula of Weir.<sup>36</sup> Delta efficiency was calculated as previously described.<sup>37</sup>

The homeostasis model analysis index was calculated as originally described by Matthews *et al.*<sup>38</sup> as fasting insulin concentration ( $\mu U ml^{-1}$ )  $\times$  fasting glucose concentration ( $mmol l^{-1}$ )/22.5.

The short, interviewer-administered International Physical Activity Questionnaire identifies the frequency and duration of moderate and vigorous leisure time physical activity, walking physical activity and inactivity during the past week. Total energy expenditures ( $kcal day^{-1}$ ) were calculated from the International Physical Activity Questionnaire according to guidelines.<sup>39</sup>

**Statistics**

Results are presented as means  $\pm$  s.e.m, if not otherwise stated. One-way and two-way analyses of variance with repeated measures for time factor were performed. In all cases, two-tailed testing was applied and  $P < 0.05$  was used as

the level of significance. Statistical analysis was performed using Sigma Stat 3.1 (Sigmastat, SPSS, Erkrath, Germany).

**Results**

*Body composition,  $VO_{2max}$ , physical activity and energy expenditure*

Age, height, lean body mass and  $VO_{2max}$  for both UB and lower body were similar in the three groups (Table 1). According to the study design, body weight, body fat and BMI were higher ( $P < 0.05$ ) in O compared with the other groups, but similar between PO and C (Table 1).

At rest, energy expenditure was significantly higher in O compared with PO and C, but the respiratory exchange ratio was similar between the groups (Table 1). PO reported significantly higher total energy expenditure than O and C (Table 1); however, despite this, there were no significant differences between groups in the individual components, that is, in vigorous or moderate physical activity or in the time spent walking or sitting (data not shown).

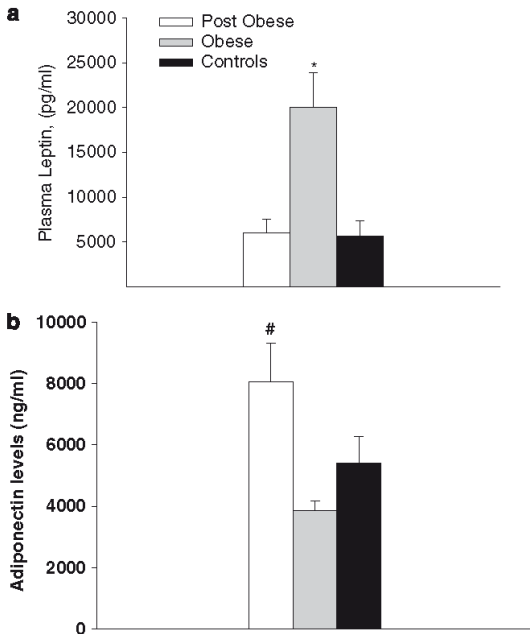
*Glucose tolerance, free FAs and adipokines*

Glucose tolerance was lower in O than in C and PO, as shown by higher ( $P < 0.05$ ) capillary plasma glucose concentrations both before ( $5.4 \pm 0.1$  vs  $4.9 \pm 0.2$  and  $4.9 \pm 0.1 mmol l^{-1}$ , respectively) and after oral glucose tolerance test ( $6.6 \pm 0.3$  vs  $4.9 \pm 0.4$  and  $5.5 \pm 0.4 mmol l^{-1}$ , respectively). Venous fasting plasma glucose ( $5.5 \pm 0.1$ ,  $5.1 \pm 0.1$  and  $4.9 \pm 0.1 mmol l^{-1}$  in O, C and PO, respectively) and insulin concentrations ( $89.5 \pm 10.2$ ,  $47.6 \pm 7.8$ ,  $39.7 \pm 6.9 pmol l^{-1}$  in O, C and PO, respectively) were significantly higher in O than in the two other groups. As a consequence, the calculated homeostasis model analysis index was significantly higher in O than in the other groups ( $21.9 \pm 2.6$ ,  $10.6 \pm 1.6$  and  $8.8 \pm 1.6$  in O, C and PO,

**Table 1** Characteristics of male postobese, obese and control subjects

	Postobese (n = 10) mean $\pm$ s.e.m.	Obese (n = 10) mean $\pm$ s.e.m.	Control (n = 10) mean $\pm$ s.e.m.
Age (years)	31.5 $\pm$ 1.6	30.4 $\pm$ 2.3	31.2 $\pm$ 1.5
Height (cm)	184 $\pm$ 2	184 $\pm$ 3	184 $\pm$ 3
Weight (kg)	90.2 $\pm$ 3.1	115.0 $\pm$ 5.4*	91.0 $\pm$ 4.2 <sup>†</sup>
BMI ( $kg m^{-2}$ )	26.6 $\pm$ 0.7	33.8 $\pm$ 1.0*	26.6 $\pm$ 0.6 <sup>†</sup>
Body fat (%)	22.8 $\pm$ 1.8	34.9 $\pm$ 1.6*	24.7 $\pm$ 1.8 <sup>†</sup>
LBM (kg)	66.8 $\pm$ 1.5	69.2 $\pm$ 3.2	65.5 $\pm$ 1.9
LB $VO_{2max}$ ( $l min^{-1}$ )	3.7 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.1
LB $VO_{2max}$ ( $ml min^{-1} kg^{-1}$ per LBM)	55.1 $\pm$ 2.0	50.0 $\pm$ 2.6	54.6 $\pm$ 1.5
UB $VO_{2max}$ ( $l min^{-1}$ )	2.7 $\pm$ 1.2	2.5 $\pm$ 0.9	2.5 $\pm$ 1.2
UB $VO_{2max}$ ( $ml min^{-1} kg^{-1}$ per LBM)	40.7 $\pm$ 1.5	37.0 $\pm$ 2.0	37.5 $\pm$ 1.9
RER at rest	0.79 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.02	0.81 $\pm$ 0.02
Resting energy expenditure ( $kcal day^{-1}$ )	1812 $\pm$ 63	2131 $\pm$ 119*	1803 $\pm$ 49 <sup>†</sup>
Total energy expenditure (IPAQ)( $kcal day^{-1}$ )	6039 $\pm$ 1616 <sup>‡</sup>	2582 $\pm$ 668*	1959 $\pm$ 425

Data are mean  $\pm$  s.e.m. Abbreviations: BMI, body mass index; IPAQ, International Physical Activity Questionnaire; LB, lower body; LBM, lean body mass; RER, respiratory exchange ratio; UB, upper body;  $VO_{2max}$ , maximal oxygen consumption. \* ( $P < 0.05$ ) obese vs postobese, <sup>†</sup> ( $P < 0.05$ ) obese vs control, <sup>‡</sup> ( $P < 0.05$ ) postobese vs control.



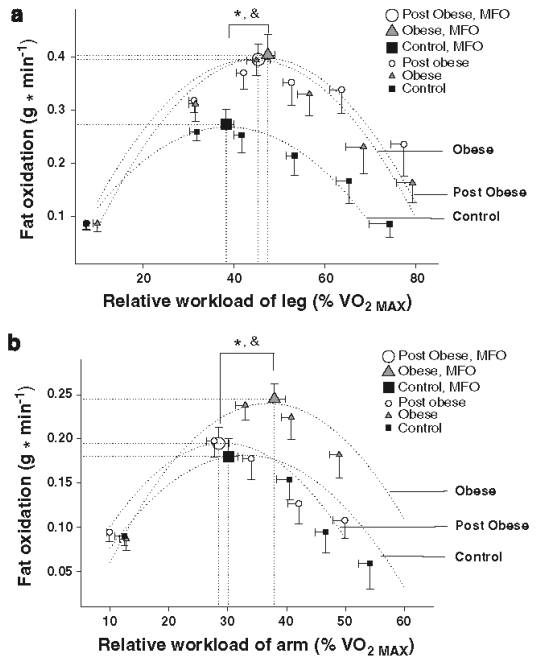
**Figure 1** Plasma leptin (a) and plasma adiponectin (b) concentration at rest in male postobese, obese and control subjects. Data are means  $\pm$  s.e.m. \* ( $P < 0.05$ ) Obese vs postobese and control, # ( $P < 0.05$ ) postobese vs obese and control.

respectively). Despite differences in basal plasma glucose levels, blood glycosylated haemoglobin concentration was not different between groups ( $5.2 \pm 0.1$ ,  $5.3 \pm 0.1$  and  $5.1 \pm 0.1\%$  in PO, O and C, respectively). Fasting plasma NEFA concentrations at rest were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in O than in PO and C ( $411 \pm 164$ ,  $264 \pm 115$  and  $280 \pm 151 \mu\text{mol l}^{-1}$  in O, C and PO, respectively). Plasma leptin was significantly higher in O than in the other groups (Figure 1a), whereas plasma adiponectin was significantly higher in PO than in C and O (Figure 1b). Plasma interleukin-8 did not differ significantly between groups ( $1.79 \pm 0.42$ ,  $1.03 \pm 0.31$  and  $2.37 \pm 0.94 \text{ pg ml}^{-1}$  in O, C and PO, respectively).

*Fat oxidation and delta efficiency: regional differences*

Peak fat oxidation during leg cycling ( $404 \pm 41$  and  $396 \pm 29$  vs  $267 \pm 28 \text{ mg min}^{-1}$ ) was higher ( $P < 0.05$ ), and FatMax occurred at a higher ( $P < 0.05$ ) relative workload ( $47.4 \pm 1.5$  and  $45.3 \pm 2.6$  vs  $38.3 \pm 1.8\% \text{ VO}_{2\text{max}}$ ) in O and PO than in C (Figure 2a). The delta efficiency during bicycling was similar between groups ( $24.1 \pm 0.7$ ,  $24.5 \pm 0.7$ ,  $23.9 \pm 0.7\%$  in O, C and PO, respectively).

Peak fat oxidation during arm cranking was higher ( $P < 0.05$ ) in O than in C ( $245 \pm 19$  vs  $182 \pm 20 \text{ mg min}^{-1}$ ),



**Figure 2** Whole-body fat oxidation during graded bicycle (a) or arm cranking (b) exercise as a function of workload ( $\% \text{VO}_{2\text{max}}$ ) in male postobese, obese and control subjects. Data are means  $\pm$  s.e.m. \* ( $P < 0.05$ ) obese vs control, & ( $P < 0.05$ ) postobese vs control. The large symbols represent the peak fat oxidation and the exercise intensity at which it occurs (Fatmax). The small symbols are the actual points measured during the graded exercise tests. The bell-shaped dotted curves represent the average of the fitted curves for all subjects in each group.

whereas a trend ( $P = 0.08$ ) towards higher values in O compared with PO ( $245 \pm 19$  vs  $195 \pm 19 \text{ mg min}^{-1}$ ) was found. FatMax occurred at a higher ( $P < 0.05$ ) relative workload in O than in PO and C ( $37.9 \pm 2.0$  vs  $30.1 \pm 1.7$  and  $28.5 \pm 1.7\% \text{ VO}_{2\text{max}}$ , in O, C and PO, respectively). During the arm cranking exercise, the estimated fat oxidation rates were significantly higher in O than in C and PO at exercise intensities above 40% of  $\text{VO}_2$  armpeak. The delta efficiency during arm cranking was similar in the three groups ( $19.7 \pm 0.4$ ,  $20.9 \pm 1.1$  and  $19.1 \pm 1.0\%$  in O, C and PO, respectively).

*Muscle fibre types and metabolic enzymes*

The relative content of type I, IIA and IIX fibres was similar in the leg (m. vastus lateralis) and arm (m. deltoideus) muscles, as well as between groups (Table 2). There were no significant differences in either fibre-type area or capillarization between groups in either arm or leg muscles (Table 2). In m. vastus lateralis, CS activity was not significantly different between groups, whereas in m. deltoideus, CS activity was

**Table 2** Muscle fibre type, size and enzyme activity in deltoid and v. lateralis muscles of male postobese, obese and control subjects

	Postobese		Obese		Control	
	Leg	Arm	Leg	Arm	Leg	Arm
<i>Fibre type (%)</i>						
Type I	52.0 ± 7.3	44.9 ± 4.8	43.1 ± 3.9	47.8 ± 4.1	49.6 ± 3.8	53.7 ± 4.3
Type IIa	38.0 ± 5.8	34.6 ± 4.7	40.6 ± 3.8	30.1 ± 2.5	38.9 ± 3.8	31.6 ± 5.1
Type IIx	10.0 ± 2.3	20.5 ± 3.8	16.2 ± 3.5	22.1 ± 2.8	11.5 ± 2.7	14.8 ± 3.3
<i>Fibre size/area (10<sup>3</sup> μm<sup>2</sup>)</i>						
Capil. per fibre (capil. per fibre)	4.4 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.2
Capil. per area (cap/mm <sup>2</sup> )	433 ± 28	385 ± 19	417 ± 24	430 ± 31	431 ± 26	371 ± 20
CS activity (μmol g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	85.7 ± 10.6	55.2 ± 2.4 <sup>†</sup>	69.8 ± 4.9	45.2 ± 5.2 <sup>*†</sup>	91.0 ± 6.2	54.8 ± 3.8 <sup>††</sup>
HAD activity (μmol g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	88.8 ± 11.0	71.5 ± 2.3	83.5 ± 5.5	64.3 ± 5.5 <sup>†</sup>	98.3 ± 5.8	67.4 ± 5.3 <sup>†</sup>
HSL activity (mU mg <sup>-1</sup> )	0.254 ± 0.01		0.254 ± 0.01		0.225 ± 0.012	
Glycogen (nmol mg <sup>-1</sup> )	359 ± 49	336 ± 28	340 ± 30	310 ± 34	380 ± 42	299 ± 30
IMTG (nmol mg <sup>-1</sup> )	144 ± 20	140 ± 23	207 ± 19 <sup>*</sup>	321 ± 53 <sup>*</sup>	131 ± 18 <sup>††</sup>	165 ± 25 <sup>†</sup>
SOCS3 (au)	0.925 ± 0.143	0.662 ± 0.155	1.182 ± 0.103	0.744 ± 0.128 <sup>†</sup>	1.014 ± 0.134	0.975 ± 0.168
pAMPK (au)	0.198 ± 0.048	0.579 ± 0.126 <sup>†</sup>	0.167 ± 0.019	0.361 ± 0.040 <sup>†</sup>	0.238 ± 0.037	0.296 ± 0.045
pACC (au)	1.645 ± 0.139 <sup>†</sup>	2.282 ± 0.258 <sup>†</sup>	1.000 ± 0.139	2.875 ± 0.253 <sup>†</sup>	1.605 ± 0.198 <sup>†</sup>	1.720 ± 0.188 <sup>†</sup>

Abbreviations: au, arbitrary units; capil., capillarization; CS, citrate synthase; HAD, β-hydroxy-acyl-CoA-dehydrogenase; HSL, hormone-sensitive lipase; IMTG, intramuscular triacylglycerol; pAMPK, phosphorylated 5'-AMP-activated protein kinase; pACC, phosphorylated acetyl-CoA carboxylase; SOCS3, suppressor of cytokine signaling-3. Data are mean ± s.e.m. \**P* < 0.05 in relation to PO group, †(*P* < 0.05) in relation to O, ††(*P* < 0.05) arm vs leg.

lower (*P* < 0.05) in O than in PO and C (Table 2). In the three groups, CS activity was lower (*P* < 0.05) in the arm than in the leg muscles (Table 2).

There was no between-group differences in arm or leg muscle HAD activity; however, in O and C, HAD activity was lower (*P* < 0.05) in m. deltoideus than in m. vastus lateralis (Table 2). The three groups had similar HSL activity in m. vastus lateralis (Table 2). Muscle glycogen stores were similar in arm and leg muscles in the three groups (Table 2). In m. vastus lateralis, the triacylglycerol content was higher (*P* < 0.05) in O than in C, and in m. deltoideus, the triacylglycerol content was higher (*P* < 0.05) in O than in PO and C (Table 2).

#### Muscle AMPK and ACC phosphorylation and SOCS3 protein expression

The three groups had similar basal AMPK phosphorylation levels and SOCS3 protein expression (Table 2). In m. vastus lateralis, ACC phosphorylation levels were lower (*P* < 0.05) in O than in PO and C, whereas in m. deltoideus, ACC phosphorylation levels were lower (*P* < 0.05) in C than in O (Table 2). Moreover, when m. deltoideus was compared with m. vastus lateralis, C had similar AMPK and ACC phosphorylation levels and SOCS3 protein expression, whereas O had significantly lower SOCS3 protein expression and higher AMPK and ACC phosphorylation levels in m. deltoideus than in m. vastus lateralis (Table 2). PO individuals had higher AMPK and ACC phosphorylation levels but not SOCS3 protein expression in m. deltoideus compared with m. vastus lateralis (Table 2). In m. vastus lateralis, there was negative correlation between the level of ACC phosphorylation and triacylglycerol content (*R* = -0.38, *P* < 0.05),

whereas this relationship was not statistically significant in m. deltoideus.

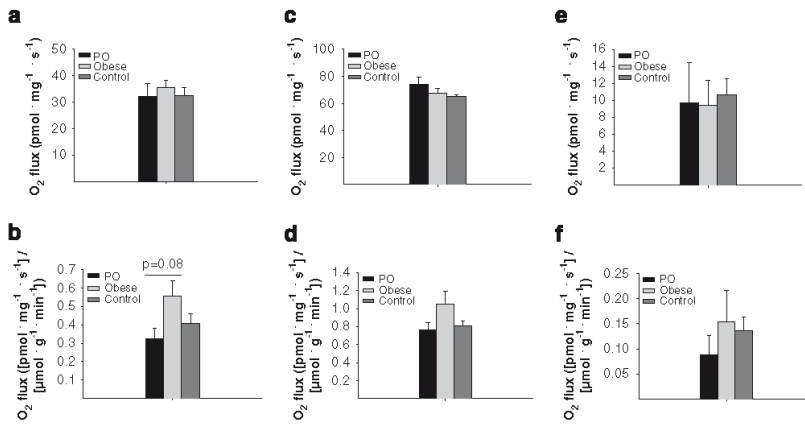
#### Mitochondrial respiration

The mitochondrial O<sub>2</sub> flux per mg muscle tissue was not different between the three groups. When O<sub>2</sub> flux per mg muscle tissue was normalized for CS activity (index of mitochondrial density), there were no differences in mitochondrial respiration between groups (Figure 3), although for the normalized maximal coupled state 3 respiration, a trend (*P* = 0.08) towards a higher respiration in O compared with PO was observed (Figure 3b). Across all analyses performed, we did not observe any response to the addition of cytochrome *c*, indicating a preserved integrity of the outer mitochondrial membrane (data not shown).

#### Discussion

This study demonstrates that O and PO compared with C subjects, matched for lower body VO<sub>2</sub> peak values, have an increased capacity to oxidize fat during leg exercise, and this occurs at a higher relative exercise intensity. Furthermore, the study demonstrates that mitochondrial oxidative capacity was not impaired in O and PO compared with C subjects.

The capacity to oxidize fat in the muscle is determined by several factors such as percentage of type I fibres, mitochondrial density and HAD and HSL enzyme activities.<sup>40,41</sup> However, in this study, O compared with PO and C subjects had similar muscle fibre type, capillarization, pre-exercise glycogen stores and CS, HAD and HSL activities in the



**Figure 3** Mitochondrial respiration (O<sub>2</sub> flux per mg tissue) in leg (vastus lateralis) muscle from postobese, obese and control subjects. Mitochondrial respiration is measured with (a) malate, octanoyl carnitine, ADP and glutamate (state 3 respiration with electron input from complex I+II); (c) malate, octanoyl carnitine, ADP, glutamate and succinate (state 3 maximal coupled respiration with parallel electron input from complex I+II); and (e) malate and octanoyl carnitine (state 2 respiration with electron input from complex I+II). (b, d and f) Show mitochondrial respiration (O<sub>2</sub> flux per mg tissue) normalized for mitochondrial content (CS activity) with the protocol specified in (a, c and e) above, respectively. Data are means ± s.e.m.

m. vastus lateralis. Another mechanism that could facilitate muscle fat oxidation is an increased availability of free fatty acid (FFA).<sup>1</sup> In line with this, we observed increased circulating levels of FFA and augmented intra-muscular triglyceride concentrations in arm and leg muscles, which could explain the enhanced capacity to oxidize fat during both arm cranking and bicycling in the O compared with C subjects. In agreement, Goodpaster *et al.*<sup>7</sup> reported that total fatty acid oxidation during moderate-intensity exercise tended to be higher in O than in lean men. Furthermore, they demonstrated that the higher fat oxidation in O compared with lean individuals was due to higher oxidation of FAs derived from non-plasma sources, as plasma FA oxidation was similar.<sup>7</sup> It must be highlighted that Goodpaster *et al.*<sup>7</sup> matched their O and C lean subjects for VO<sub>2max</sub>, as we did in this study. Our results also agree with those of Horowitz and Klein,<sup>42</sup> who reported an ~25% greater whole-body FA oxidation in O compared with lean women. In line with this, Horowitz and Klein<sup>42</sup> showed that women with abdominal obesity have an increased utilization of intra-muscular triglycerides during exercise. In contrast to our results, it has been reported that fat oxidation capacity is reduced in extremely O individuals, even after weight loss.<sup>8,11,42</sup> However, in these studies, subjects were not matched for physical fitness and physical activity.

Another important finding from this study is that PO subjects with a steady body composition retain an increased capacity to oxidize fat during leg exercise but not during arm exercise when compared with Cs of similar body composition. This increased capacity to oxidize fat during exercise in the PO group was observed despite muscle triglyceride concentration, mitochondrial function and CS, HAD and HSL activities being similar to those of Cs. Thus, the

increased capacity to oxidize fat in PO and O individuals is most likely caused by regulatory mechanisms that could involve other lipolytic enzymes such as adipose triglyceride lipase,<sup>43</sup> which may be upregulated in obesity, or by changes in malonyl coenzyme A, an allosteric inhibitor of carnitine palmitoyltransferase-1, the rate-limiting enzyme controlling transfer of long-chain fatty acyl-coenzyme As into the mitochondria for oxidation.<sup>44</sup>

An important question raised by this study is why fat oxidation during exercise is only normalized in arm and not leg muscle in PO individuals. One possible explanation is that, in our study, adiponectin levels were 33% higher in PO individuals than in Cs who had similar fat mass. Adiponectin promotes FA oxidation in muscle and liver,<sup>45</sup> and this is primarily mediated by the activation of 5'-AMPK. In skeletal muscle cells, AMPK increases FA oxidation by inhibiting ACC through phosphorylation, which reduces intracellular malonyl coenzyme A levels and thereby relieves the inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1; this ultimately increases the influx and oxidation of long-chain FAs into the mitochondria.<sup>46</sup> However, in the PO group, resting phosphorylated AMPK and phosphorylated ACC levels were comparable to those observed in the C group, despite higher adiponectin levels, implying that this cannot explain the fact that fat oxidation is not normalized during leg exercise in PO individuals. On the other hand, when levels of these molecules in arm and leg muscles were compared within each group, both PO and O subjects showed disproportionate levels between arm and leg muscle, whereas C subjects had comparable levels. This may reflect the fact that, in the basal situation, the level of phosphorylation of AMPK and ACC could be differently regulated in arm and leg muscle in PO and O individuals compared with C. Moreover, the fact

that fat oxidation was normalized during arm cranking but not during bicycling implies that local regulatory factors predominate. This also opens up the possibility of a differential regulation of fat oxidation during exercise in arm and leg muscles. The mechanism behind the presence of higher plasma adiponectin levels in PO compared with C subjects with a similar body fat mass is not readily apparent. Although  $\text{VO}_{2\text{max}}$  is not higher in PO compared with C subjects, the observed higher energy expenditure implies a higher level of daily physical activity, which is known to increase plasma adiponectin levels.<sup>47,48</sup> Previous studies have reported adipose tissue hyperplasia in the PO state,<sup>49</sup> and it is possible that this may also influence the fasting basal adiponectin levels.

In addition to adiponectin, skeletal muscle FA metabolism can also be stimulated acutely by leptin, both in lean rodents and humans.<sup>50,51</sup> However, the signalling isoform of the leptin receptor is reduced in skeletal muscle of O compared with lean subjects.<sup>9</sup> In theory, reduced leptin sensitivity could influence lipid oxidation during exercise, but this study cannot address this issue. The presence of similar cytokine signalling-3 (SOCS3) in the muscle between groups implies that differences in SOCS3 expression do not seem to contribute to the increased capacity to use fat during exercise in obesity. In skeletal muscle, leptin may downregulate leptin signalling by inducing the protein SOCS3, which blunts JAK2/STAT3-dependent leptin signalling<sup>52</sup> and thereby causes leptin resistance in the muscle.<sup>53</sup>

The present findings have several implications. As previously shown by others,<sup>18-20</sup> our data indicate that muscle metabolism has a non-homogeneous distribution between arms and legs. The fact that, in other populations, arm and leg muscles are different in terms of glucose clearance<sup>18</sup> and also in FA kinetics, with the legs but not the arms being impaired at baseline and during a hyperinsulinemic-euglycaemic clamp,<sup>20</sup> is in line with our findings, in which increased fat oxidation in PO subjects was only observed during leg exercise, but not during arm exercise.

Finally, the postulate that impaired muscle mitochondrial function is present in obesity has in the latter years received considerable attention.<sup>54,55</sup> Menshikova *et al.*<sup>55</sup> found that fewer mitochondria and a reduced oxidative capacity in skeletal muscle were present in obesity,<sup>55</sup> and a deficiency of electron transport chain activity in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria fractions in obesity has been reported by the same group.<sup>56</sup> In contrast, we previously found higher respiration in deltoideus muscle in O compared with lean C subjects, normalized relative to CS activity.<sup>13</sup> In this study, we also found no reduction in mitochondrial respiration in O individuals, supporting the concept that mitochondrial function is not impaired in obesity. Acute weight loss seems to reduce skeletal muscle mitochondrial respiration,<sup>57</sup> but very few data are available in relation to weight loss and mitochondrial respiration in humans. In our study, PO individuals had similar mitochondrial respiration after long-term weight loss as Cs.

There are several causes that could lead to a decreased mitochondrial content, for instance, genetic disposition towards a specific fibre-type composition. However, fibre-type distribution was assessed in our study and no differences between groups were present.

In conclusion, a major finding in this study was that O individuals exhibited a higher MFO during leg and arm exercise compared with matched Cs. In PO individuals, the higher MFO during leg exercise compared with matched Cs persisted despite weight loss, whereas during arm exercise, MFO was normalized. Surprisingly, and in contrast to our hypothesis, fat oxidative capacity or mitochondrial oxidative capacity was not attenuated in PO individuals. The arm-to-leg differences in fat oxidation reported here may reflect the different degree of utilization of the extremities in man and may in future provide a means to bring out the role of daily physical activity in the changes occurring in muscle as a result of obesity and subsequent weight loss.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from the Novo Nordisk Foundation, The Danish Medical Research Council, The Foundation of 1870, the Christian d. 10 foundation, Programa Europa XXI Obra Social CAI-DGA (CM 3/05 and CM 7/06) and from Gobierno de Aragon (FMI010/09).

## References

- Holloszy JO, Kohrt WM, Hansen PA. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Front Biosci* 1998; 3: D1011-D1027.
- Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol* 1999; 277 (6 Part 1): E1130-E1141.
- Kim JY, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol* 2000; 279: E1039-E1044.
- Perez-Martin A, Dumortier M, Raynaud E, Brun JF, Fedou C, Bringer J *et al.* Balance of substrate oxidation during submaximal exercise in lean and obese people. *Diabetes Metab* 2001; 27 (4 Part 1): 466-474.
- Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J* 1999; 13: 2051-2060.
- Thyfault JP, Kraus RM, Hickner RC, Howell AW, Wolfe RR, Dohm GL. Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E1076-E1081.
- Goodpaster BH, Wolfe RR, Kelley DE. Effects of obesity on substrate utilization during exercise. *Obes Res* 2002; 10: 575-584.

- 8 Kanaley JA, Cryer PE, Jensen MD. Fatty acid kinetic responses to exercise. Effects of obesity, body fat distribution, and energy-restricted diet. *J Clin Invest* 1993; **92**: 255–261.
- 9 Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H *et al*. Leptin receptor 170 KDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. *Exp Physiol* 2010; **95**: 160–171.
- 10 Hojlund K, Mogensen M, Sahlin K, Beck-Nielsen H. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008; **37**: 713–731, x.
- 11 Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; **51**: 2944–2950.
- 12 Mogensen M, Sahlin K, Fernstrom M, Glinborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H *et al*. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2007; **56**: 1592–1599.
- 13 Larsen S, Ara I, Rabol R, Andersen JL, Boushel R, Dela F *et al*. Are substrate use during exercise and mitochondrial respiratory capacity decreased in arm and leg muscle in type 2 diabetes? *Diabetologia* 2009; **52**: 1400–1408.
- 14 Menshikova EV, Ritov VB, Toledo FG, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Effects of weight loss and physical activity on skeletal muscle mitochondrial function in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; **288**: E818–E825.
- 15 Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morrioni M, Cinti S *et al*. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 2002; **51**: 144–151.
- 16 Kempen KP, Saris WH, Kuipers H, Glatz JF, van DV. Skeletal muscle metabolic characteristics before and after energy restriction in human obesity: fibre type, enzymatic beta-oxidative capacity and fatty acid-binding protein content. *Eur J Clin Invest* 1998; **28**: 1030–1037.
- 17 Raben A, Mygind E, Astrup A. Lower activity of oxidative key enzymes and smaller fiber areas in skeletal muscle of postobese women. *Am J Physiol Endocrinol* 1998; **38**: E487–E494.
- 18 Olsen DB, Sacchetti M, Dela F, Ploug T, Saltin B. Glucose clearance is higher in arm than leg muscle in type 2 diabetes. *J Physiol* 2005; **565** (Part 2): 555–562.
- 19 Reynolds TH, Supiano MA, Dengel DR. Regional differences in glucose clearance: effects of insulin and resistance training on arm and leg glucose clearance in older hypertensive individuals. *J Appl Physiol* 2007; **102**: 985–991.
- 20 Sacchetti M, Olsen DB, Saltin B, van Hall G. Heterogeneity in limb fatty acid kinetics in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005; **48**: 938–945.
- 21 Bergström J. Muscle electrolytes in man: determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. A study on normal subjects, kidney patients and patients with chronic diarrhea. *Scand J Clin Lab Invest* 1962; **68** (Supplementum): 11–13.
- 22 Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. *Med Sci Sports Exerc* 2002; **34**: 92–97.
- 23 Washburn RA, Seals DR. Comparison of peak oxygen uptake in arm cranking. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1983; **51**: 3–6.
- 24 Smith PM, Doherty M, Price MJ. The effect of crank rate on physiological responses and exercise efficiency using a range of submaximal workloads during arm crank ergometry. *Int J Sports Med* 2006; **27**: 199–204.
- 25 Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz W S. Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008; **3**: 965–976.
- 26 Brooke MH, Kaiser KK. Three 'myosin ATPase' systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* 1970; **18**: 670–672.
- 27 Qu Z, Andersen JL, Zhou S. Visualisation of capillaries in human skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 1997; **107**: 169–174.
- 28 Andersen JL, Aagaard P. Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2000; **23**: 1095–1104.
- 29 Andersen JL, Schjerling P, Andersen LL, Dela F. Resistance training and insulin action in humans: effects of de-training. *J Physiol* 2003; **551** (Part 3): 1049–1058.
- 30 Langfort J, Ploug T, Ihlemann J, Baranczuk E, Donsmark M, Gorski J *et al*. Additivity of adrenaline and contractions on hormone-sensitive lipase, but not on glycogen phosphorylase, in rat muscle. *Acta Physiol Scand* 2003; **178**: 51–60.
- 31 Helge JW, Dela F. Effect of training on muscle triacylglycerol and structural lipids: a relation to insulin sensitivity? *Diabetes* 2003; **52**: 1881–1887.
- 32 Guerra B, Santana A, Fuentes T, gado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C *et al*. Leptin receptors in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; **102**: 1786–1792.
- 33 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD *et al*. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; **150**: 76–85.
- 34 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992; **24**: 145–149.
- 35 Frayn K. Calculation of substrate oxidation rates *in vivo* from gaseous exchange. *J Appl Physiol* 1983; **55**: 628–634.
- 36 Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 1949; **109**: 1–9.
- 37 Mogensen M, Bagger M, Pedersen PK, Fernstrom M, Sahlin K. Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibres but not to mitochondrial efficiency. *J Physiol* 2006; **571** (Part 3): 669–681.
- 38 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412–419.
- 39 Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE *et al*. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 2003; **35**: 1381–1395.
- 40 Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 1984; **56**: 831–838.
- 41 Turcotte LP, Richter EA, Kiens B. Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs untrained humans. *Am J Physiol* 1992; **262**: E791–E799.
- 42 Horowitz JF, Klein S. Oxidation of nonplasma fatty acids during exercise is increased in women with abdominal obesity. *J Appl Physiol* 2000; **89**: 2276–2282.
- 43 Alsted TJ, Nybo L, Schweiger M, Fedelius C, Jacobsen P, Zimmermann R *et al*. Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **296**: E445–E453.
- 44 McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 1983; **214**: 21–28.
- 45 Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S *et al*. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; **8**: 1288–1295.
- 46 Saha AK, Schwarsin AJ, Roduit R, Masse F, Kaushik V, Tornheim K *et al*. Activation of malonyl CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator AICAR. *J Biol Chem* 2000; **32**: 24279–24283.
- 47 Jurimae J, Kums T, Jurimae T. Plasma adiponectin concentration is associated with the average accelerometer daily steps counts in healthy elderly females. *Eur J Appl Physiol* 2010, e-pub ahead of print 13 March 2010.
- 48 Ring-Dimitriou S, Paulweber B, von Duvillard SP, Stadlmann M, LeMura LM, Lang J *et al*. The effect of physical activity and physical fitness on plasma adiponectin in adults with predisposition to metabolic syndrome. *Eur J Appl Physiol* 2006; **98**: 472–481.

- 49 Löfgren P, Andersson I, Adolfsson B, Leijonhufvud BM, Hertel K, Hoffstedt J *et al*. Long-term prospective and controlled studies demonstrate adipose tissue hypercellularity and relative leptin deficiency in the postobese state. *Clin Endocrinol Metab* 2005; **11**: 6207–6213.
- 50 Muoio DM, Dohn GL, Fiedorek FT, Tapscott EB, Coleman RA. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 1997; **46**: 1360–1363.
- 51 Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **283**: E187–E192.
- 52 Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30059–30065.
- 53 Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D *et al*. The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 3592–3597.
- 54 Houmard JA. Do the mitochondria of obese individuals respond to exercise training? *J Appl Physiol* 2007; **103**: 6–7.
- 55 Menshikova EV, Ritov VB, Ferrell RE, Azuma K, Goodpaster BH, Kelley DE. Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity. *J Appl Physiol* 2007; **103**: 21–27.
- 56 Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 8–14.
- 57 Rabol R, Svendsen PF, Skovbro M, Boushel R, Haugaard SB, Schjerling P *et al*. Reduced skeletal muscle mitochondrial respiration and improved glucose metabolism in nondiabetic obese women during a very low calorie dietary intervention leading to rapid weight loss. *Metabolism* 2009; **58**: 1145–1152.



## **ESTUDIO II**



REVISED VERSION: JANDROL/2011/014415

**Androgen receptor gene polymorphisms and the fat-bone axis in young men and women.**

Jesús Gustavo Ponce-González<sup>1</sup>, Amelia Guadalupe-Grau<sup>1</sup>, Francisco Germán Rodríguez-González<sup>2,3</sup>, Cecilia Dorado<sup>1</sup>, Hugo Olmedillas<sup>1</sup>, Teresa Fuentes<sup>1</sup>, Lorena Rodríguez-García<sup>1</sup>, Bonifacio Nicolás Díaz-Chico<sup>2,3</sup>, José A L Calbet<sup>1</sup>.

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

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Physiology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

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

**Running title:** “Adiposity and androgen receptors”

**Keywords:** Obesity, testosterone, leptin, osteocalcin, gen polymorphisms, steroids.

**Word count:** 3033

**Correspondence and reprints 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](mailto:lopezcalbet@gmail.com)

**Abstract**

Androgen receptor (AR)  $CAG_n$  (polyglutamine) and  $GGN_n$  (polyglycine) repeat polymorphisms determine part of the androgenic effect and may influence adiposity. The association between fat mass, and its regional distribution, with the AR  $CAG_n$  and  $GGN_n$  polymorphisms was studied in 319 and 78 physically active non-smoker men and women (mean  $\pm$  SD:  $28.3 \pm 7.6$  and  $24.8 \pm 6.2$  years old, respectively). The length of CAG and GGN repeats was determined by PCR and fragment analysis, and confirmed by DNA sequencing of selected samples. Men were grouped as CAG short ( $CAG_S$ ) if harbouring repeat lengths  $\leq 21$ , the rest as CAG long ( $CAG_L$ ). The corresponding cut-off CAG number for women was 22. GGN was considered short ( $GGN_S$ ) if  $GGN \leq 23$ , the rest as GGN long ( $GGN_L$ ). No association between AR polymorphisms and adiposity or the hormonal variables was observed in men. Neither was there a difference in the studied variables between men harboring  $CAG_L+GGN_L$ ,  $CAG_S+GGN_S$ ,  $CAG_S+GGN_L$ , and  $CAG_L+GGN_S$  combinations. However, in women,  $GGN_n$  was linearly related to the percentage of body fat ( $r=0.30$ ,  $P<0.05$ ), the percentage of fat in the trunk ( $r=0.28$ ,  $P<0.05$ ), serum leptin concentration ( $r=0.40$ ,  $P<0.05$ ), and serum osteocalcin concentration ( $r=0.32$ ,  $P<0.05$ ). In men, free testosterone was inversely associated with adiposity and serum leptin concentration, and positively with osteocalcin, even after accounting for differences in  $CAG_n$ ,  $GGN_n$  or both. In summary, this study shows that the AR repeat polymorphism has little influence on the absolute and relative fat mass or its regional distribution in physically active men. In young women, the GGN length is positively associated with adiposity, leptin and osteocalcin.

## 1 **Introduction**

2 Testosterone, osteocalcin, and leptin are three of the main hormones regulating fat mass in  
3 humans. The association between these hormones and fat mass may be modulated by  
4 polymorphic variations in the androgen receptors (Guadalupe-Grau et al, 2011; Guadalupe-Grau  
5 et al, 2010b; Nielsen et al, 2010; Zitzmann et al, 2003).

6 The AR gene contains a polyglutamine tract encoded by *CAG* repeats and a polyglycine  
7 tract (*GGN*) encoded by  $(GGT)_3GGG(GGT)_2(GGC)_n$ . In vitro experiments have shown that  
8 elimination of the *CAG* tract in both human and rat AR resulted in elevated transcriptional  
9 activation activity, while an expansion of the *CAG* repeat in human AR caused a linear decrease  
10 of transactivation function (Chamberlain et al, 1994), and reduced transcriptional potential (Lee  
11 and Chang, 2003; Tut et al, 1997). The length of the *GGN* tract (number of glycine residues) is  
12 linearly and inversely associated with *AR* protein content in cell cultures (Ding et al, 2005), and  
13 longer *GGN* tracts resulted in a linearly reduced AR activity per cell (Ding et al, 2005). Body  
14 fat accumulation and its regional distribution are in part determined by sex hormones. In men,  
15 fat mass and abdominal obesity are associated with reduced circulating androgens (Khaw and  
16 Barrett-Connor, 1992; Phillips et al, 2003), whereas testosterone has an anti-obesity effect  
17 (Mauras et al, 1998; Rolf et al, 2002; Woodhouse et al, 2004). In women, increased circulating  
18 androgens have been associated with both abdominal obesity (Garaulet et al, 2000; Hauner et al,  
19 1994) and reduced visceral fat (Turcato et al, 1997).

20 Previous studies in men from Germany (Zitzmann et al, 2003) and Denmark (Nielsen et  
21 al, 2010) reported a positive association between *CAGn* and fat mass assessed with  
22 bioimpedance (Zitzmann et al, 2003) and dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) (Nielsen et  
23 al, 2010) and MRI (Nielsen et al, 2010). It has been suggested that these findings need to be  
24 confirmed in other cohorts (Nielsen et al, 2010). Moreover, the potential interactions between  
25 *CAG* and *GGN* repeat polymorphisms combinations and fat mass have not been studied.  
26 The osteoblasts' produced hormone osteocalcin is also a negative regulator of fat mass (Ferron  
27 et al, 2008). A negative association between osteocalcin with fat mass and serum leptin has been  
28 reported in cross-sectional studies (Guadalupe-Grau et al, 2009; Kindblom et al, 2009; Pittas et

29 al, 2009); and osteocalcin blunts the expected increase in leptin concentration with fat mass  
30 accumulation in humans (Guadalupe-Grau et al, 2010a). Serum osteocalcin levels are also  
31 associated with testosterone levels in women (Ahn et al, 2010; Guadalupe-Grau et al, 2009), and  
32 in males osteocalcin stimulates testosterone production by acting on the Leydig cells (Oury et  
33 al, 2011).

34 Therefore, osteocalcin may act as a confounder, masking a potential relationship  
35 between AR polymorphism and fat mass phenotype in humans. Likewise, physical activity and  
36 fitness (Nielsen et al, 2010; Serrano-Sanchez et al, 2010; Wang et al, 2010) may also influence  
37 the relationship between AR polymorphism and the fat mass phenotype.

38 The aim of this study was to determine if androgen receptor polymorphisms are  
39 associated to fat mass and its regional distribution in young men and women, assessing how this  
40 relationship is influenced by osteocalcin and cardiorespiratory fitness ( $VO_2max$ ). We  
41 hypothesized that men and women with high *CAG* and *GN* repeat lengths would have  
42 increased fat mass after accounting for free testosterone, osteocalcin and  $VO_2max$  as  
43 confounding variables.

44

## 45 **Methods**

### 46 *Subjects*

47 Three-hundred nineteen Caucasian men and seventy-eight women agreed to participate in this  
48 study. Men and women were (mean  $\pm$  standard deviation)  $28.3 \pm 7.6$  and  $24.8 \pm 6.2$  years old;  
49 and their respective body weight, height, and percentage of body fat were  $77.8 \pm 10.2$  and  $59.8$   
50  $\pm 7.5$  Kg,  $176.8 \pm 5.6$  and  $164.5 \pm 5.9$  cm,  $18.8 \pm 7.4$  and  $28.0 \pm 6.4\%$ , in men and women,  
51 respectively. They were recruited from physically active university students, sports clubs and  
52 local police officers in Gran Canaria (Spain). Recruitment started in February 2003 and  
53 extended to March 2010. All subjects underwent a medical examination prior to inclusion in the  
54 study. Inclusion criteria were: age ranging from 18 to 60, body mass index  $< 35$ , and  
55 participation in sports or other type of physical activities with a minimum frequency of one time  
56 per week. Subjects smoking, taking any medications or having any chronic disease,

57 hypertension or orthopaedic limitations were excluded. Less than 5% of all volunteers had to be  
58 excluded, mostly due to smoking or chronic diseases. The study was performed in accordance  
59 with the Helsinki Declaration of 1975 as regards the conduct of clinical research, being  
60 approved by the Ethical Committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria. All  
61 volunteers provided their written informed consent before participation in the study.

62

### 63 *Tests*

64 The test day, between 7.30 and 8.30 a.m., subjects reported to the laboratory under fasting  
65 conditions. After lying in the supine position for at least 5 minutes, a 20 ml blood sample was  
66 obtained from an antecubital vein. Then their body composition was determined. In some  
67 subjects, an additional test was carried out on a different day to assess their  $VO_2$ max, as  
68 previously reported (Guadalupe-Grau et al, 2011).

69

### 70 *Body composition*

71 Whole-body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (QDR-  
72 1500, Hologic Corp., Software version 7.10, Waltham, MA) as previously reported (Perez-  
73 Gomez et al, 2008). Upper and lower limb lean mass (kg) was calculated from the regional  
74 analysis of the whole body scan (Sanchís-Moysi et al, 2009; Serrano-Sanchez et al, 2010),  
75 which gives a valid and a reliable estimate of muscle mass in the extremities (Kim et al, 2002).

### 76 *Serum free testosterone, leptin and osteocalcin determinations*

77 Serum leptin, free testosterone, and osteocalcin were determined by Enzyme-Linked  
78 Immunosorbent Assay (ELISA) (ELx800 Universal Microplate Reader, Bioteck  
79 Instruments Inc, Vermont, USA), using reagent kits from Linco Research (#EZHL-  
80 80SK, Linco Research St. Charles, Missouri, USA), IBL (Hamburg, Germany) and from  
81 Nordic Bioscience Diagnostics (Herlev, Denmark), respectively. Low-end sensitivity  
82 was 0.05 ng/mL for total leptin, 0.17 pg/mL for the free testosterone and 0.5 ng/mL for  
83 osteocalcin, respectively. Intra- and interassay coefficients of variation were 3.8 and

84 4.4% for leptin, 6.1 and 7.8% for free testosterone, and 6.7 and 6.7% for osteocalcin  
85 (Guadalupe-Grau et al, 2009; Guerra et al, 2008).

86

87 *CAG and GGN repeat polymorphisms*

88 DNA was extracted from blood samples (200 µl) using High Pure PCR Template Preparation  
89 Kits (Roche Applied Science). To determine the length of the *CAG* and *GGN* repeats the  
90 corresponding regions located on the exon 1 of the *AR* gene (Genbank accession no. M27423)  
91 were amplified using two pairs of primers whose sequences have been previously reported  
92 (Rodriguez et al, 2006). One primer from each pair was marked with fluorescent dye (FAM or  
93 VIC). Amplification was performed in a 25 µl reaction volume, containing 50 ng of genomic  
94 DNA, 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate, 1x Fast Start Taq DNA polymerase Buffer  
95 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 1x GC-rich solution buffer (Roche Applied  
96 Science), and 1U of Fast Start Taq DNA polymerase (Roche Applied Science). The  
97 concentration of each pair of primers was 1.2 and 1.5 µM for the amplification of the *CAG* and  
98 *GGN* repeats, respectively. PCR conditions were: 30 cycles of 95°C for 45 sec, 56°C for 30 sec  
99 and 72°C for 30 sec for *CAG* amplification; 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 2 min and  
100 72°C for 2 min for *GGN* amplification. Each PCR was initiated with a denaturation step at 95°C  
101 for 5 min and terminated with an extension step at 72°C for 5 min. The PCR product was diluted  
102 1:100 in distilled water and 1 µl of the dilution was mixed with 10µl of formamide and 0.3 µl of  
103 GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, Warrington, UK), denatured at 98°C for  
104 5 min and cooled on ice. Fragment separation was performed by automated capillary  
105 electrophoresis, using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), and the  
106 length was determined with Gene Scan Analysis Software (version 3.7) (Applied Biosystems).  
107 Internal standards supplied by the manufacturer were used for quality control. We blindly  
108 repeated the genotype analysis in 54 of the samples, and the results were totally coincident. The  
109 fragments size was confirmed by sequencing 48 DNA samples harbouring different size alleles  
110 for both repeats by using the Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystem) at



111 University of Las Palmas Sequencing Facility. Genotyping was performed specifically for  
112 research purposes based on the hypothesis that the aforementioned polymorphisms may  
113 influence leptin, osteocalcin, testosterone and fat mass. The researchers performing the  
114 genotyping were totally blinded to the subjects' identities.

115

#### 116 *Statistical analysis.*

117 All variables were checked for normal distribution using the test of *Shapiro-Wilk*. When  
118 necessary, the analysis was done on logarithmically transformed data. Since the AR gene is  
119 located in the X-chromosome and one of the two alleles is randomly inactivated in women  
120 (Lyon, 1999), we decided to calculate the mean of two alleles as representative of each pair in  
121 women (Gonzalez et al, 2007; Jaaskelainen et al, 2008). The influence of *CAG* and *GGN* repeat  
122 lengths on body composition, hormones and  $VO_2$ max was determined taking *CAG* and *GGN*  
123 repeat lengths as either continuous or dichotomous variables with allele cut-off thresholds. The  
124 relationship between *CAG* and *GGN* as continuous variables with body composition, hormones  
125 and physical fitness variables was examined using linear regression analysis. The median value  
126 which resulted in the most balanced grouping was used as a cut-off threshold (Hickey et al,  
127 2002; Rodriguez-Gonzalez et al, 2009). Thus, men were grouped as *CAG* short ( $CAG_S$ ) if  
128 harbouring repeat lengths  $\leq 21$  and *CAG* long ( $CAG_L$ ) if harbouring repeat lengths  $> 21$ . Women  
129 were grouped as *CAG* short ( $CAG_S$ ) if harbouring repeat lengths  $\leq 22$  and *CAG* long ( $CAG_L$ ) if  
130 harbouring repeat lengths  $> 22$ . Men and women were ascribed to the *GGN* short ( $GGN_S$ ) group  
131 if harbouring repeat lengths of  $\leq 23$ , otherwise they were included in the *GGN* long ( $GGN_L$ )  
132 group. These median *CAG* and *GGN* values are identical to those reported for the population of  
133 Gran Canaria (Rodriguez-Gonzalez et al, 2009) and similar to those observed in other Caucasian  
134 cohorts (Ruhayel et al, 2004; Shah et al, 2008; Stanworth et al, 2008). In addition, men were  
135 also grouped if having any of the following haplotype combinations:  $CAG_S+CGN_L$ ,  
136  $CAG_L+CGN_S$ ,  $CAG_L+CGN_L$  and  $CAG_S+CGN_S$ .

137 To determine if the association between *CAG* and *GGN* repeat numbers and body  
138 composition variables is influenced by free testosterone, partial correlation coefficients were

139 calculated after adjustment for free testosterone. The association between GGN repeat length  
140 with adiposity (percentage of body fat) and serum leptin concentration in women was assessed  
141 by calculating the partial correlation coefficients adjusted for free testosterone, osteocalcin and  
142  $VO_2max$ .

143 The impact of AR was assessed separately in men and women. Comparisons between  
144 short and long polymorphic variants were carried out using the Student's t-test. Lean mass was  
145 corrected for differences in height by dividing muscle mass by height<sup>2</sup> (Lietzke, 1956).

146

## 147 **Results**

148 The median CAG repeat length was 21 in men and 22 in women, ranging from 13 to 35, and from  
149 9 to 33 repeats, respectively. Men and women had a median GGN repeat length of 23, ranging  
150 from 12 to 28 and from 15 to 26, respectively.

151 In men and women, CAG<sub>S</sub> and CAG<sub>L</sub> groups had similar body composition and similar  
152 concentrations of leptin, osteocalcin and testosterone (Table 1). Likewise, in men and women,  
153 leptin, osteocalcin and testosterone concentrations were similar in GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> groups  
154 (Table 2). However, women with a GAG<sub>L</sub> repeat length polymorphism were about 3 cm taller  
155 than their GAG<sub>S</sub> counterparts.

156 There was no relationship between CAG and GGN repeat length and either body  
157 composition or hormonal variables in men, nor between CAG repeat length and body  
158 composition or hormonal variables in women.

159 In women, the length of GGN repeat AR repeat polymorphism was linearly related to the  
160 logarithm of the percentage of body fat ( $Lg \% fat = 1.7 \times Lg GGN - 0.87$ ,  $r = 0.30$ ,  $P < 0.05$ ); the  
161 logarithm of the percentage of fat in the trunk ( $Lg \% fat Trunk = 2.5 \times Lg GGN - 2.15$ ,  $r = 0.28$ ,  
162  $P < 0.05$ ); the logarithm of serum leptin concentration ( $Lg leptin = 6.2 \times Lg GGN - 7.46$ ,  $r = 0.40$ ,  
163  $P < 0.05$ ); and the logarithm of serum osteocalcin concentration ( $Lg osteocalcin = 2.3 \times Lg GGN -$   
164  $1.87$ ,  $r = 0.32$ ,  $P < 0.05$ ). The association between GGN repeat length with adiposity and serum  
165 leptin concentration remained statistically significant after accounting for free testosterone,  
166 osteocalcin and  $VO_2max$ , in women (Table 3).

167 In men, the logarithm of free testosterone was inversely associated with adiposity and  
168 serum leptin concentration, and positively with osteocalcin (Table 4). These associations  
169 remained unchanged after accounting for differences in CAG, GGN or both CAG and GGN  
170 repeat length.

171 Adiposity and the serum concentrations of free testosterone, leptin, and osteocalcin were  
172 similar in men harboring the allelic combinations CAG<sub>L</sub>+GGN<sub>L</sub>, CAG<sub>S</sub>+GGN<sub>S</sub>, CAG<sub>S</sub>+GGN<sub>L</sub>,  
173 and CAG<sub>L</sub>+GGN<sub>S</sub>.

174

## 175 **Discussion**

176 In contrast, with our hypothesis no association was observed in our young men between AR  
177 length polymorphic variations and adiposity or serum leptin concentration. Moreover, this lack  
178 of association remained after adjusting for osteocalcin, free testosterone and cardiorespiratory  
179 fitness (VO<sub>2</sub>max). In women, however, a consistent association between GGN repeat length  
180 with adiposity and serum leptin concentration was observed. This association was even stronger  
181 after accounting for osteocalcin, free testosterone and VO<sub>2</sub>max as confounders. Like in men, the  
182 CAG repeat length was not associated with adiposity or serum leptin concentration in women.

183 Thus, our results indicate that, in young men, the AR polymorphism is not associated  
184 with whole body fat mass, its relative amount or its regional distribution. This finding is in  
185 contrast with a previous study in 106 men from Germany, who had a similar mean age (28  
186 years) compared to ours, in which the CAG repeat length was associated with the percentage of  
187 body fat (assessed with bioimpedance:  $r=0.27$ ). Likewise, in a study of young Danish men (20-  
188 29 years old), a weak ( $r=0.06$ ) but statistically significant association between the CAG repeat  
189 number and the percentage of body fat measured by DXA was reported (Nielsen et al, 2010). In  
190 the latter, no association between CAG repeat number and visceral fat measured using MRI in  
191 393 subjects was observed (Nielsen et al, 2010). Stanworth et al. reported in 232 men with type  
192 2 diabetes, a positive association of CAG repeat number with leptin, waist circumference, and  
193 body mass index (Stanworth et al, 2008).

194 In agreement with our results, no association between the CAG repeat number and the  
195 percentage of body fat (assessed with bioimpedance) was reported by Goutou et al. in 170 men  
196 (mean age: 42) from Greece (Goutou et al, 2009). Thus, in young men, the CAG repeat number  
197 has little or no influence on adiposity, with small differences between countries, which could be  
198 due to genetic and environmental differences. As a novelty, we have shown for the first time  
199 that there is no association in young men between the GGN repeat number and adiposity.

200 The possibility for an interaction between the CAG and GGN repeat polymorphism and  
201 fat mass has not been previously studied in young men. The CAG<sub>S</sub> + GGN<sub>S</sub> microsatellite  
202 combination has been associated to stronger androgen signalling (Gonzalez Hernandez et al,  
203 2008a; Navarro et al, 2002). However, our results indicate lack of interaction between CAG and  
204 GGN repeat numbers and adiposity in men, since men harboring the allelic combinations  
205 CAG<sub>L</sub>+GGN<sub>L</sub>, CAG<sub>S</sub>+GGN<sub>S</sub>, CAG<sub>S</sub>+GGN<sub>L</sub>, and CAG<sub>L</sub>+GGN<sub>S</sub> have similar adiposity  
206 phenotypes.

207 In agreement with previous studies (Gonzalez Hernandez et al, 2008b), no relationship  
208 was observed in the present investigation between CAG repeat number and serum leptin  
209 concentration in either sex. However, in women a strong association between the GGN repeat  
210 number and serum leptin concentration was observed, which could not be accounted for by  
211 differences in free testosterone. This association may be indirect, i.e., due to lower anti-obesity  
212 effects of testosterone in women with higher GGNn, resulting in increased fat mass. However, it  
213 may be also mediated by a direct inhibitory effect of testosterone derived androgens in the  
214 adipocytes (Pineiro et al, 1999). In fact, testosterone administration in female subjects decreased  
215 leptin levels beyond the expected level from the reduction of fat mass (Elbers et al, 1997). The  
216 effect of leptin on target cells depends on its circulating free fraction, which is determined by  
217 soluble leptin receptor (sOB-R), the main leptin-binding protein in plasma (Chan et al, 2002;  
218 Lou et al, 2010). Free plasma testosterone has been reported to be inversely related to sOB-R  
219 (Ara et al, 2006; Chan et al, 2002), although the potential role played by androgens and AR in  
220 regulation of sOB-R remains unknown.

221 In agreement with previous studies in middle-aged (Krithivas et al, 1999; Stiger et al,  
222 2008) and aged men (Van Pottelbergh et al, 2001), no association between CAG or GGN length  
223 and free testosterone levels were observed in the present investigation.

224 The regulation of osteocalcin production in man remains unknown (Foresta et al, 2011).  
225 Androgen receptor knockout (ARKO) male mice have disrupted adipogenesis and osteogenesis  
226 leading to osteoporosis and late onset obesity (Kawano et al, 2003; Tsai et al, 2011). Transgenic  
227 models indicate that, in males, osteocalcin stimulates testosterone production by acting on the  
228 Leydig cells (Oury et al, 2011). In turn, dihydrotestosterone stimulates the expression and  
229 release of osteocalcin from the human male adipose tissue (Foresta et al, 2011). In agreement, a  
230 positive association between osteocalcin and free testosterone was observed in men, which was  
231 not significantly influenced by the AR genotypes. In contrast, no association was observed  
232 between free testosterone and osteocalcin in women. However, in a recent nine-week strength  
233 training study we observed a significant association between changes in free testosterone and  
234 changes in serum osteocalcin in women ( $r=57$ ,  $n=23$ ) (Guadalupe-Grau et al, 2009). In  
235 agreement with a role for androgens in the regulation of serum osteocalcin in women, we found  
236 a positive association between the length of the GGN tract and serum osteocalcin in the present  
237 study. It remains to be determined whether estradiol interacts with testosterone to regulate  
238 osteocalcin levels in women.

239 In summary, this study shows that the androgen receptor repeat polymorphism has, if any,  
240 little influence in the absolute and relative fat mass or its regional distribution in physically  
241 active non-smoker men, whereas, in young women, the GGN repeat number is positively  
242 associated with adiposity. These findings could indicate that under conditions of reduced  
243 androgen levels, like observed in females, an increased number of androgen receptors and,  
244 hence, androgen-mediated transcriptional potential, due to lower GGN repeat number may favor  
245 an androgenic mediated reduction in adipose mass and serum leptin concentration.

246 **References**

- 247 Ahn KH, Lee SH, Park HT, Kim T, Hur JY, Kim YT, Kim SH. Effect of adiponectin and sex steroid  
248 hormones on bone mineral density and bone formation markers in postmenopausal women with  
249 subclinical hyperthyroidism. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010;36:370-376.
- 250 Ara I, Perez-Gomez J, Vicente-Rodriguez G, Chavarren J, Dorado C, Calbet JA. Serum free testosterone,  
251 leptin and soluble leptin receptor changes in a 6-week strength-training programme. *Br J Nutr.*  
252 2006;96:1053-1059.
- 253 Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the  
254 androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.*  
255 1994;22:3181-3186.
- 256 Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating  
257 soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and  
258 interventional studies in humans. *Diabetes.* 2002;51:2105-2112.
- 259 Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism  
260 in the human androgen receptor on androgen action. *The Prostate.* 2005;62:133-139.
- 261 Elbers JM, Asscheman H, Seidell JC, Frolich M, Meinders AE, Gooren LJ. Reversal of the sex difference  
262 in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *J Clin Endocrinol*  
263 *Metab.* 1997;82:3267-3270.
- 264 Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene  
265 expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad*  
266 *Sci U S A.* 2008;105:5266-5270.
- 267 Foresta C, Strapazzon G, De Toni L, Gianesello L, Bruttocao A, Scarda A, Plebani M, Garolla A.  
268 Androgens modulate osteocalcin release by human visceral adipose tissue. *Clin Endocrinol (Oxf).*  
269 2011.
- 270 Garaulet M, Perex-Llamas F, Fuente T, Zamora S, Tebar FJ. Anthropometric, computed tomography and  
271 fat cell data in an obese population: relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor-alpha,  
272 sex hormone-binding globulin and sex hormones. *Eur J Endocrinol.* 2000;143:657-666.
- 273 Gonzalez A, Javier Dorta F, Rodriguez G, Brito B, Rodriguez MA, Cabrera A, Diaz-Chico JC, Reyes R,  
274 Aguirre-Jaime A, Nicolas Diaz-Chico B. Increased risk of breast cancer in women bearing a  
275 combination of large CAG and GGN repeats in the exon 1 of the androgen receptor gene. *Eur J*  
276 *Cancer.* 2007;43:2373-2380.
- 277 Gonzalez Hernandez A, Cabrera de Leon A, Dominguez Coello S, Almeida Gonzalez D, Rodriguez Perez  
278 MC, Brito Diaz B, Aguirre-Jaime A, Diaz-Chico BN. Serum Resistin and Polymorphisms of  
279 Androgen Receptor CAG(n) and GGN(n) and Aromatase TTTA(n). *Obesity (Silver Spring).*  
280 2008a;16:2107-2112.
- 281 Gonzalez Hernandez A, Cabrera de Leon A, Dominguez Coello S, Almeida Gonzalez D, Rodriguez Perez  
282 MC, Brito Diaz B, Aguirre-Jaime A, Diaz-Chico BN. Serum resistin and polymorphisms of  
283 androgen receptor GAGn and GGn and aromatase TTTAn. *Obesity (Silver Spring).*  
284 2008b;16:2107-2112.
- 285 Goutou M, Sakka C, Stakias N, Stefanidis I, Koukoulis GN. AR CAG repeat length is not associated with  
286 serum gonadal steroids and lipid levels in healthy men. *Int J Androl.* 2009;32:616-622.
- 287 Guadalupe-Grau A, Ara I, Dorado C, Vicente-Rodriguez G, Perez-Gomez J, Cabrero JC, Serrano-  
288 Sanchez JA, Santana A, Calbet JA. Osteocalcin as a negative regulator of serum leptin  
289 concentration in humans: insight from triathlon competitions. *Eur J Appl Physiol.* 2010a;110:635-  
290 643.

- 291 Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Chavaren J, Dorado C, Santana A, Serrano-Sanchez  
292 JA, Calbet JA. Strength training combined with plyometric jumps in adults: sex differences in fat-  
293 bone axis adaptations. *J Appl Physiol*. 2009;106:1100-1111.
- 294 Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C, Olmedillas H, Fuentes T, Perez-Gomez J,  
295 Delgado-Guerra S, Vicente-Rodriguez G, Ara I, Guerra B, Arteaga-Ortiz R, Calbet JA, Diaz-Chico  
296 BN. Androgen receptor gene polymorphisms lean mass and performance in young men. *Br J Sports  
297 Med*. 2011;45:95-100.
- 298 Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, Olmedillas H, Fuentes T,  
299 Perez-Gomez J, Sanchis-Moysi J, Diaz-Chico BN, Calbet JA. Bone mass and the CAG and GGN  
300 androgen receptor polymorphisms in young men. *PLoS ONE*. 2010b;5:e11529.
- 301 Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A, Ponce-Gonzalez  
302 JG, Dorado C, Calbet JA. Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and  
303 insulin sensitivity. *PLoS ONE*. 2008;3:e3466.
- 304 Hauner H, Bogner E, Blum A. Body fat distribution and its association with metabolic and hormonal risk  
305 factors in women with angiographically assessed coronary artery disease. Evidence for the presence  
306 of a metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 1994;105:209-216.
- 307 Hickey T, Chandy A, Norman RJ. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome  
308 inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *J  
309 Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:161-165.
- 310 Jaaskelainen J, Korhonen S, Kuulasmaa T, Kurl S, Niskanen L, Vanhala M, Hippelainen M, Voutilainen  
311 R, Heinonen S. Androgen receptor gene CAG repeat length in women with metabolic syndrome.  
312 *Gynecol Endocrinol*. 2008;24:411-416.
- 313 Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, Nakamura T, Fukuda T, Yoshimura  
314 K, Yoshizawa T, Aihara K, Yamamoto Y, Nakamichi Y, Metzger D, Chambon P, Nakamura K,  
315 Kawaguchi H, Kato S. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl  
316 Acad Sci U S A*. 2003;100:9416-9421.
- 317 Khaw KT, Barrett-Connor E. Lower endogenous androgens predict central adiposity in men. *Ann  
318 Epidemiol*. 1992;2:675-682.
- 319 Kim J, Wang Z, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Gallagher D. Total-body skeletal muscle mass:  
320 estimation by a new dual-energy X-ray absorptiometry method. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:378-383.
- 321 Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellstrom D. Plasma  
322 osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone  
323 Miner Res*. 2009;24:785-791.
- 324 Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M, Longcope C, McKinlay JB,  
325 Kantoff PW. Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the  
326 age-related decline in serum androgen levels in men. *J Endocrinol*. 1999;162:137-142.
- 327 Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor:  
328 mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4043-4054.
- 329 Lietzke MH. Relation between weightlifting totals and body weight. *Science*. 1956;124:486-487.
- 330 Lou PH, Yang G, Huang L, Cui Y, Pourbahrani T, Radda GK, Li C, Han W. Reduced body weight and  
331 increased energy expenditure in transgenic mice over-expressing soluble leptin receptor. *PLoS  
332 ONE*. 2010;5:e11669.
- 333 Lyon MF. X-chromosome inactivation. *Curr Biol*. 1999;9:R235-237.

- 334 Mauras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K, Dokler M, Veldhuis JD, Urban RJ. Testosterone  
335 deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and  
336 adiposity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:1886-1892.
- 337 Navarro D, Luzardo OP, Fernandez L, Chesa N, Diaz-Chico BN. Transition to androgen-independence in  
338 prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;81:191-201.
- 339 Nielsen TL, Hagen C, Wraae K, Bathum L, Larsen R, Brixen K, Andersen M. The impact of the CAG  
340 repeat polymorphism of the androgen receptor gene on muscle and adipose tissues in 20-29-year-  
341 old Danish men: Odense Androgen Study. *Eur J Endocrinol.* 2010;162:795-804.
- 342 Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P,  
343 Karsenty G. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell.* 2011;144:796-809.
- 344 Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez JJ, Dorado C,  
345 Calbet JA. Role of muscle mass on sprint performance: gender differences? *Eur J Appl Physiol.*  
346 2008;102:685-694.
- 347 Phillips GB, Jing T, Heymsfield SB. Relationships in men of sex hormones, insulin, adiposity, and risk  
348 factors for myocardial infarction. *Metabolism.* 2003;52:784-790.
- 349 Pineiro V, Casabiell X, Peino R, Lage M, Camina JP, Menendez C, Baltar J, Dieguez C, Casanueva F.  
350 Dihydrotestosterone, stanozolol, androstenedione and dehydroepiandrosterone sulphate inhibit  
351 leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue in vitro: lack of effect  
352 of testosterone. *J Endocrinol.* 1999;160:425-432.
- 353 Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and  
354 markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:827-832.
- 355 Rodriguez-Gonzalez G, Ramirez-Moreno R, Perez P, Bilbao C, Lopez-Rios L, Diaz-Chico JC, Lara PC,  
356 Serra-Majem L, Chirino R, Diaz-Chico BN. The GGN and CAG repeat polymorphisms in the  
357 exon-1 of the androgen receptor gene are, respectively, associated with insulin resistance in men  
358 and with dyslipidemia in women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;113:202-208.
- 359 Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R, Falcon O, Jr., Diaz BP, Rivero JF,  
360 Perucho M, Diaz-Chico BN, Diaz-Chico JC. Alleles with short CAG and GGN repeats in the  
361 androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *Int J Cancer.*  
362 2006;118:1420-1425.
- 363 Rolf C, von Eckardstein S, Koken U, Nieschlag E. Testosterone substitution of hypogonadal men  
364 prevents the age-dependent increases in body mass index, body fat and leptin seen in healthy  
365 ageing men: results of a cross-sectional study. *Eur J Endocrinol.* 2002;146:505-511.
- 366 Ruhayel Y, Lundin K, Giwercman Y, Hallden C, Willen M, Giwercman A. Androgen receptor gene GGN  
367 and CAG polymorphisms among severely oligozoospermic and azoospermic Swedish men. *Human*  
368 *reproduction (Oxford, England).* 2004;19:2076-2083.
- 369 Sanchis-Moysi J, Idoate F, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Alayón S, Carreras A, Dorado C, Calbet  
370 JAL. The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, inter-arm asymmetry  
371 and muscle fiber type distribution. *Scand J Med Sci Sports.* 2009;20:524-534.
- 372 Serrano-Sanchez JA, Delgado-Guerra S, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Arteaga-Ortiz R, Sanchis-  
373 Moysi J, Dorado C, Calbet JA. Adiposity and age explain most of the association between physical  
374 activity and fitness in physically active men. *PLoS ONE.* 2010;5:e13435.
- 375 Shah NA, Antoine HJ, Pall M, Taylor KD, Azziz R, Goodarzi MO. Association of androgen receptor  
376 CAG repeat polymorphism and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*  
377 2008;93:1939-1945.



- 378 Stanworth RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH. Androgen receptor CAG repeat polymorphism is  
379 associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin in men with type 2 diabetes.  
380 *Eur J Endocrinol.* 2008;159:739-746.
- 381 Stiger F, Brandstrom H, Gillberg P, Melhus H, Wolk A, Michaelsson K, Kindmark A. Association  
382 Between Repeat Length of Exon 1 CAG Microsatellite in the Androgen Receptor and Bone  
383 Density in Men is Modulated by Sex Hormone Levels. *Calcif Tissue Int.* 2008.
- 384 Tsai MY, Shyr CR, Kang HY, Chang YC, Weng PL, Wang SY, Huang KE, Chang C. The reduced  
385 trabecular bone mass of adult ARKO male mice results from the decreased osteogenic  
386 differentiation of bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411:477-482.
- 387 Turcato E, Zamboni M, De Pergola G, Armellini F, Zivelonghi A, Bergamo-Andreis IA, Giorgino R,  
388 Bosello O. Interrelationships between weight loss, body fat distribution and sex hormones in pre-  
389 and postmenopausal obese women. *J Intern Med.* 1997;241:363-372.
- 390 Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen  
391 receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male  
392 infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3777-3782.
- 393 Van Pottelbergh I, Lumbroso S, Goemaere S, Sultan C, Kaufman JM. Lack of influence of the androgen  
394 receptor gene CAG-repeat polymorphism on sex steroid status and bone metabolism in elderly  
395 men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;55:659-666.
- 396 Wang HY, Hu Y, Wang SH, Shan QL, Li YC, Nie J, Yi LY, Bao DP, Xu CY, He ZH. Association of  
397 androgen receptor CAG repeat polymorphism with VO<sub>2</sub>max response to hypoxic training in North  
398 China Han men. *Int J Androl.* 2010;33:794-799.
- 399 Woodhouse LJ, Gupta N, Bhasin M, Singh AB, Ross R, Phillips J, Bhasin S. Dose-dependent effects of  
400 testosterone on regional adipose tissue distribution in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab.*  
401 2004;89:718-726.
- 402 Zitzmann M, Gromoll J, von Eckardstein A, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen  
403 receptor gene modulates body fat mass and serum concentrations of leptin and insulin in men.  
404 *Diabetologia.* 2003;46:31-39.
- 405
- 406
- 407

**408 Acknowledgments**

409 The authors thank José Navarro de Tuero for his excellent technical assistance. This study was  
410 supported by Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56076-C06-04/ACTI) and FEDER,  
411 Gobierno de Canarias (PI2005/177), FUNCIS (PI/10/07), Consejería de Educación, Cultura y  
412 Deportes del Gobierno de Canarias (2006/179 0001 and FEDER), Proyecto Interreg IIIB  
413 BIOPOLIS, Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC), Cabildo de  
414 Gran Canaria, Cabildo de Tenerife and La Caja de Canarias, and Proyecto Estructurante  
415 “Integración de los grupos de investigación en Ciencias de la Salud”, ULPGC, Gobierno de  
416 Canarias. None of the authors has conflicts of interest. All financial sources have been reported.

**Table 1.** Body composition, anthropometrics, physical activity, fitness and hormones in men and women with CAG<sub>S</sub> and CAG<sub>L</sub> androgen receptor polymorphisms (mean  $\pm$ SD).

	Men				Women			
	CAG <sub>S</sub>	n	CAG <sub>L</sub>	n	CAG <sub>S</sub>	n	CAG <sub>L</sub>	n
Age (years)	27.5 $\pm$ 7.5	175	28.9 $\pm$ 7.5	144	24.0 $\pm$ 5.3	46	26.3 $\pm$ 7.4	31
Height (cm)	176.4 $\pm$ 5.4	175	177.3 $\pm$ 5.8	144	163.3 $\pm$ 5.5*	47	166.4 $\pm$ 6.0	31
Body mass (kg)	76.9 $\pm$ 9.8	174	78.9 $\pm$ 10.7	141	59.1 $\pm$ 6.9	47	60.7 $\pm$ 8.3	31
Percentage of body fat (%)	18.6 $\pm$ 6.8	174	19.1 $\pm$ 8.0	141	27.1 $\pm$ 5.6	47	29.3 $\pm$ 7.3	31
Lean body mass (kg)	59.2 $\pm$ 5.8	174	60.2 $\pm$ 5.4	141	40.6 $\pm$ 3.8	47	40.2 $\pm$ 3.1	31
Whole body fat mass (kg)	14.7 $\pm$ 6.7	174	15.7 $\pm$ 8.5	141	16.2 $\pm$ 4.9	47	18.3 $\pm$ 6.8	31
Trunk fat mass (kg)	6.8 $\pm$ 4.1	174	7.4 $\pm$ 5.2	141	5.9 $\pm$ 2.7	48	7.4 $\pm$ 4.5	31
Percentage of trunk fat (%)	17.6 $\pm$ 8.8	174	18.4 $\pm$ 10.2	141	20.7 $\pm$ 6.9	47	24.4 $\pm$ 10.0	31
Sports history (years)	8.1 $\pm$ 6.3	160	8.2 $\pm$ 5.3	135	8.0 $\pm$ 8.3	40	6.8 $\pm$ 7.9	27
VO <sub>2</sub> max (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	47.2 $\pm$ 7.9	160	46.5 $\pm$ 7.9	129	40.8 $\pm$ 8.5	38	38.7 $\pm$ 7.2	26
Leptin (ng.ml <sup>-1</sup> )	4.7 $\pm$ 4.7	155	5.0 $\pm$ 4.8	133	13.1 $\pm$ 6.9	36	15.1 $\pm$ 8.3	30
Osteocalcin (ng.ml <sup>-1</sup> )	21.5 $\pm$ 7.3	159	21.6 $\pm$ 8.8	128	18.4 $\pm$ 6.2	37	21.1 $\pm$ 7.2	29
Free testosterone (pg.ml <sup>-1</sup> )	20.9 $\pm$ 11.1	149	21.0 $\pm$ 9.6	127	3.9 $\pm$ 1.9	34	3.4 $\pm$ 1.9	29

\* P<0.05 compared with CAG<sub>L</sub> (same gender).

**Table 2.** Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in men and women with GGN<sub>s</sub> and GGN<sub>L</sub> androgen receptor polymorphisms (mean  $\pm$ SD).

	Men				Women			
	GGN <sub>s</sub>	n	GGN <sub>L</sub>	n	GGN <sub>s</sub>	n	GGN <sub>L</sub>	n
Age (years)	27.9 $\pm$ 7.0	197	28.5 $\pm$ 8.3	122	25.8 $\pm$ 7.4	34	24.3 $\pm$ 5.2	43
Height (cm)	176.7 $\pm$ 5.6	197	177.1 $\pm$ 5.6	122	165.1 $\pm$ 6.4	35	164.0 $\pm$ 5.4	43
Body mass (kg)	77.2 $\pm$ 9.7	194	78.8 $\pm$ 11.0	121	60.0 $\pm$ 8.8	35	59.6 $\pm$ 6.2	43
Percentage of body fat (%)	18.4 $\pm$ 7.1	194	19.5 $\pm$ 7.8	121	27.7 $\pm$ 8.0	35	28.3 $\pm$ 4.7	43
Lean body mass (kg)	59.5 $\pm$ 5.8	194	59.8 $\pm$ 5.4	121	40.6 $\pm$ 3.8	35	40.3 $\pm$ 3.4	43
Whole body fat mass (kg)	14.6 $\pm$ 6.8	194	16.0 $\pm$ 8.5	121	17.1 $\pm$ 7.4	35	17.0 $\pm$ 4.2	43
Trunk fat mass (kg)	6.8 $\pm$ 4.3	194	7.5 $\pm$ 5.1	121	6.8 $\pm$ 4.7	36	6.3 $\pm$ 2.3	43
Percentage of trunk fat (%)	17.5 $\pm$ 9.3	194	18.6 $\pm$ 9.7	121	22.2 $\pm$ 10.7	35	22.1 $\pm$ 6.0	43
Sports history (years)	7.9 $\pm$ 6.0	177	8.5 $\pm$ 5.8	118	7.0 $\pm$ 8.5	31	8.0 $\pm$ 7.8	36
VO <sub>2</sub> max (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	47.3 $\pm$ 7.8	171	46.3 $\pm$ 8.0	118	40.4 $\pm$ 7.3	33	39.5 $\pm$ 8.8	31
Leptin (ng.ml <sup>-1</sup> )	4.8 $\pm$ 4.6	177	5.0 $\pm$ 5.0	111	13.7 $\pm$ 8.3	30	14.3 $\pm$ 7.1	36
Osteocalcin (ng.ml <sup>-1</sup> )	21.4 $\pm$ 8.2	175	21.7 $\pm$ 7.8	112	18.3 $\pm$ 5.7	30	20.7 $\pm$ 7.4	36
Free testosterone (pg.ml <sup>-1</sup> )	21.7 $\pm$ 11.0	173	19.6 $\pm$ 9.3	103	3.8 $\pm$ 2.1	30	3.5 $\pm$ 1.7	33

**Table 3.** Relationship between the logarithm of GGN repeat length with adiposity and serum leptin concentration in women after accounting for free testosterone, osteocalcin and  $VO_2$ max in women (n=45).

	Fat mass <sup>a</sup>	% BF <sup>a</sup>	Trunk fat <sup>a</sup>	% Trunk fat <sup>a</sup>	Leptin (ng.ml <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
logarithm of GGN	-0.34*	-0.41*	-0.33*	-0.39*	-0.31*

<sup>a</sup> Logarithmically transformed; \* P<0.05

**Table 4.** Relationship between free testosterone, adiposity, leptin and osteocalcin in men (n=259).

	Fat mass	% BF	Trunk fat	% Trunk fat	Leptin (ng.ml <sup>-1</sup> )	Osteocalcin (ng.ml <sup>-1</sup> )
Free testosterone (pg.ml <sup>-1</sup> )	-0.26*	-0.28*	-0.28*	-0.29*	-0.25*	0.22*
Adjusted for LgCAG	-0.27*	-0.29	-0.30*	-0.30*	-0.25*	0.22
Adjusted for LgGGN	-0.27*	-0.29*	-0.30*	-0.30*	-0.25*	0.22*
Adjusted for LgCAG and LgGGN	-0.27*	-0.29*	-0.30*	-0.30*	-0.25*	0.22*

\* P&lt;0.05

## **ESTUDIO III**





## **Androgen receptor gene polymorphisms fat mass accumulation, and maximal fat oxidation capacity. A longitudinal study.**

Jesús Gustavo Ponce-González<sup>1</sup>, Amelia Guadalupe-Grau<sup>1</sup>, Francisco Germán Rodríguez-González<sup>2,3</sup>, Cecilia Dorado<sup>1</sup>, Rafael S. de Torres-Peralta<sup>1</sup>, David Morales-alamo<sup>1</sup>, Lorena Rodríguez-García<sup>1</sup>, Bonifacio Nicolás Díaz-Chico<sup>2,3</sup>, José A L Calbet<sup>1</sup>.

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

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Physiology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

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

Running title: Androgen receptor polymorphism and fat mass accumulation

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](mailto:lopezcalbet@gmail.com)

## 1 **Abstract**

2 Androgens play an important role in the regulation of lipolysis and fat tissue mass. The  
3 cellular sensitivity to androgens varies depending on polymorphic variations of androgen  
4 receptors (AR). The aim of this longitudinal study was to evaluate if extreme CAG and GGN  
5 repeat polymorphisms of the AR may influence body fat mass, its regional distribution, fat  
6 accumulation, basal metabolic rate, and basal and maximal fat oxidation (MFO), maximal  
7 oxygen uptake ( $VO_{2max}$ ), as well as the serum concentration of hormones implicated in the  
8 regulation of fat mass like leptin, testosterone and osteocalcin. CAG and GGN repeats length  
9 were measured in 319 young and physically active men (mean  $\pm$  SD:  $28.3 \pm 7.6$  years old).  
10 From these we selected the subjects with short ( $CAG_S; \leq 19$ ) and long ( $CAG_L; \geq 24$ ) CAG  
11 repeats, and the subjects with short ( $GGN_S; \leq 22$ ) and long ( $GGN_L; \geq 25$ ) GGN repeats, using  
12 the median CAG and GGN value as a cut off value. CAG repeat polymorphism was not  
13 associated to fat mass.  $CAG_S$  and  $CAG_L$  subjects had similar basal metabolic rate and  
14 maximal fat oxidation capacity and accumulated comparable amounts of fat tissue over  $6.4 \pm$   
15  $1.0$  years of follow up. Men with  $GGN \leq 22$  had greater whole body and trunk fat mass than  
16 men with  $GGN \geq 25$ . This concurs with a trend for a greater maximal fat oxidation capacity in  
17 the  $GGN_L$  group ( $P=0.06$ ), who accumulated less fat mass, particularly in the trunk region  
18 seven years later. In the whole group of subjects the  $VO_{2max}$  (per kg of lower extremity lean  
19 mass) explained 53% of the variance in MFO, whilst age explained an additional 5%. In  
20 conclusion, the CAG repeat polymorphism has little, if any, influence in fat mass deposition  
21 in young adults whilst a long GGN polymorphic variant may protect from fat mass  
22 accumulation.

23

24

## 25 **Introduction**

26 In most cases, obesity is associated with reduced circulating androgens and a high  
27 concentration of leptin in plasma, which is associated with leptin and insulin resistance in  
28 peripheral tissues, such as skeletal muscle<sup>1-4</sup>. Body fat accumulation and its regional  
29 distribution are in part determined by sex hormones. In men, fat mass and abdominal obesity  
30 is associated with lower circulating androgens<sup>5-6</sup>, whereas testosterone has an anti-obesity  
31 effect<sup>7-9</sup>. The concentration of leptin in plasma is proportional to the size of the fat mass, but  
32 for a given amount of fat mass (and BMI) women have a higher concentration of circulating  
33 free leptin compared with men<sup>10-12</sup>. This fact has been explained by the differences in the  
34 circulating androgens between men and women, because testosterone reduces leptin  
35 secretion<sup>13</sup>.

36 Another endocrine factor with a major influence in fat mass is the osteoblasts'  
37 produced hormone osteocalcin, which is also a negative regulator of fat mass and serum leptin  
38<sup>14-17</sup>. Serum osteocalcin levels stimulate testosterone production by acting on the Leydig cells  
39 in male transgenic models<sup>18</sup>. Therefore, osteocalcin may act as a confounder, masking a  
40 potential relationship between AR polymorphism and fat mass phenotype in humans.

41 Previous studies have shown that male androgen receptor (AR) knockout (AR<sup>-y</sup>) mice  
42 develop obesity and exhibit insulin and leptin resistance accompanied by altered lipid  
43 metabolic profiles and dyslipidemia<sup>19-20</sup>. These data suggest that circulating androgen action  
44 by AR might play a direct regulatory role in leptin synthesis and secretion by adipocytes. The  
45 association between androgen hormones, leptin and fat mass may be modulated by  
46 polymorphic variations in the androgen receptors<sup>21-24</sup>.

47 The AR gene contains a polyglutamine tract encoded by CAG repeats and a  
48 polyglycine tract (GGN) encoded by (GGT)3GGG(GGT)2(GGC)n. Short CAG repeats are

49 associated with increased AR transactivation activity and stronger transcriptional potential<sup>25-</sup>  
50 <sup>26</sup>, whereas short GGN repeats are associated with increased AR protein content in cell  
51 cultures, that may in turn enhance the response to androgen stimulation<sup>27-28</sup>.

52 A positive association of CAGn with fat mass and serum leptin has been described by  
53 previous studies<sup>21-22, 29</sup>. However, other researches did not find an association between the  
54 CAG repeat polymorphism and whole body fat or testosterone levels<sup>30-34</sup>.

55 On the other hand, GGN polymorphism has been less studied. The association  
56 between GGN repeats and body fat is also controversial with some studies reporting no  
57 association<sup>30-31</sup> whilst Gustafson et al. reported that middle aged and old men who had both a  
58 rare GGN (not 17) and short CAG ( $\leq 23$ ) had higher waist-to-hip ratios than the rest of the  
59 studied population.

60 We hypothesised that the influence of AR polymorphisms on body fat mass, its  
61 regional distribution and leptin levels should be accentuated in men with extreme GGN and  
62 CAG repeat numbers. Since the accumulation of fat mass over the years is multifactorial and  
63 may be related to maximal fat oxidation capacity of the muscles, we also hypothesized that  
64 men with smaller GGN or CAG repeat number will have greater fat oxidation capacity and  
65 will be less prone to accumulate fat mass over the years.

66 Therefore, this study had two main aims. First, to determine if men with short CAG or  
67 GGN polymorphisms (<25 percentile) have greater fat oxidation capacity than those with  
68 longer CAG or GGN polymorphisms (>75 percentile). Second, to determine if men with short  
69 CAG or GGN polymorphisms accumulate less fat tissue over the years at the whole body and  
70 trunk region than those with longer CAG or GGN polymorphisms, after accounting for  
71 confounding factors like basal energy expenditure, maximal fat oxidation (MFO) and physical  
72 fitness.

## 73 **Methods**

### 74 *Subjects*

75 Initially, this study included 319 Caucasian men. They were recruited from physically active  
76 university students, sports clubs and local police officers from Gran Canaria (Spain). All  
77 subjects underwent a medical examination. Inclusion criteria were: age ranging from 18 to 60,  
78 body mass index < 35, and participation in sports or other kind of physical activities with a  
79 minimum frequency of once a week. Subjects smoking, taking any kind of medications or  
80 having any chronic disease, hypertension or orthopaedic limitations were excluded. Less than  
81 5% of all volunteers had to be excluded, mostly due to smoking or chronic diseases. After  
82 determination of the AR CAG and GGN polymorphisms (see below) Subjects pertaining to  
83 the first or fourth quartile for CAG or GGN repeat numbers were contacted again and about  
84 half of them agreed to participate in this follow up study. The study was performed in  
85 accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as regards the conduct of clinical research,  
86 being approved by the Ethical Committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria.  
87 After receiving written and verbal information on the potential risk and benefits of the study  
88 all subjects signed a consent form to participate in this study. The longitudinal study was  
89 finished in August 2010. *Tests*

90 The initial tests were carried out on four different days. The first testing day, subjects reported  
91 to the laboratory between 7.30 and 8.30 a.m. after an overnight fast. After lying in the supine  
92 position for at least 5 minutes a 20 ml blood sample was obtained from an antecubital vein.  
93 On the second testing day their body composition and jumping performance were determined.  
94 The third testing day was used to assess their running speed (30 meters sprint) and their  
95 anaerobic capacity (300 meters sprint). The last day, an additional test was carried out to  
96 measure their VO<sub>2</sub>max, as previously reported <sup>24</sup>.

97           Approximately 6-7 years later, subjects reported back to the laboratory after an  
98 overnight fast for the measurement of body composition by DXA, basal energy expenditure  
99 and maximal fat oxidation (MFO) by indirect calorimetry, and their VO<sub>2</sub>max. All subjects  
100 responded a Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire. Subjects were  
101 requested to refrain from non-habitual exercise, caffeine or alcohol drinks, for at least 24h  
102 prior to the test <sup>35</sup>.

### 103 *Leptin, free testosterone and osteocalcin assays*

104 Serum leptin, free testosterone and osteocalcin were determined by Enzyme-Linked  
105 Immunosorbent Assay (ELISA) (ELx800 Universal Microplate Reader, Biotek Instruments  
106 Inc, Vermont, USA), using reagent kits from Linco Research (#EZHL-80SK, Linco Research  
107 St. Charles, Missouri, USA) for leptin, from IBL (Hamburg, Germany) for free testosterone  
108 and from Nordic Bioscience Diagnostics (Herlev, Denmark) for osteocalcin. The sensitivity  
109 of the assays was: 0.05 ng/mL for total leptin, 0.17 pg/mL for free testosterone, and 0.5  
110 ng/mL for osteocalcin. Intra- and interassay coefficients of variation were 3.8 and 4.4% for  
111 leptin, 6.1 and 7.8% for free testosterone, 6.7 and 6.7% for osteocalcin.

### 112 *Body composition*

113 Whole body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (QDR-  
114 1500, Hologic Corp., Software version 7.10, Waltham, MA) as reported in Perez-Gomez et al.  
115 <sup>36</sup>. Upper and lower limb lean mass (kg) was calculated from the regional analysis of the  
116 whole body scan <sup>37-38</sup>, which gives a valid and reliable estimate of muscle mass in the  
117 extremities <sup>39</sup>.

118

119 *Vertical jump performance and running sprint tests*

120 The vertical forces generated during vertical jumps were measured with a force plate (Kistler  
121 Quattro Jump, Winterthur, Switzerland) and sampled at 500 Hz. Subjects performed 2  
122 different types of vertical jumps<sup>40</sup>: "Squat Jumps" (SJ) and "Countermovement Jumps"  
123 (CMJ). The SJ started with the knees bent at 90° and without previous counter movement.  
124 The CMJ started from a standing position allowing for counter movement, with the intention  
125 of reaching knee bending angles of around 90° just before impulsion (during the SJ and CMJ,  
126 the hands were placed on the hips).

127 A 30-m sprint, starting in a stationary position, was performed on the basketball court.  
128 Time was recorded by 7 photocells prepared every 5 meters (General ASDE, Valencia,  
129 Spain). The timer was automatically activated upon crossing the first cell and corresponding  
130 records were collected at distances of 5 and 30 meters. To perform this test subjects were  
131 encouraged to run as fast as possible the 30 meters. Each subject performed 3 trials and the  
132 fastest was taken as the representative value of the test.

133 *Anaerobic capacity*

134 An all-out 300-m running test was used to estimate the anaerobic capacity, since the  
135 anaerobic metabolic pathways contribute more than 50% to the overall energy expenditure  
136 during all-out exercise tests with duration between 30 and 60 s<sup>41-42</sup>. The test was performed  
137 on a 400-m track; the time was recorded manually with a digital stopwatch.

138 *Indirect calorimetry*

139 After overnight fast, basal energy expenditure was measured during 30 minutes while the  
140 subject lied supine on a bed using a metabolic cart (Vmax N29; Sensormedics, California,  
141 USA). This was followed by an incremental exercise test to determine the maximal fat

142 oxidation (MFO), and the intensity at which MFO occurred (FatMax) during leg cycling<sup>43</sup>.  
143 The test started at 30 Watt for 5 min, followed by 30 Watt increments every 3 min. When  
144 subjects reached an RER>1.0 the exercise was stopped at the end of the corresponding 3 min  
145 period load. After 5 minutes of recovery, subject performed an incremental test (30 W/min)  
146 beginning in the last load of the MFO test to determine their VO<sub>2</sub>max. Subjects were  
147 instructed to maintain a cranking rate of 80 rpm. Whole-body fat and glucose oxidation were  
148 calculated from VO<sub>2</sub> and VCO<sub>2</sub> values during the last 60 s of each exercise step in the graded  
149 exercise tests, using standard indirect calorimetry equations<sup>44</sup>. It was assumed that protein  
150 oxidation was similar and small during the incremental exercise tests in the four groups  
151 studied.

#### 152 *CAG and GGN repeat polymorphisms*

153 DNA was extracted from blood samples (200 µl) using High Pure PCR Template Preparation  
154 Kits (Roche Applied Science). To determine the length of the CAG and GGN repeats the  
155 corresponding regions located on the exon 1 of the AR gene (Genbank accession no. M27423)  
156 were amplified using two pairs of primers whose sequences have been previously reported<sup>45</sup>.  
157 One primer from each pair was marked with fluorescent dye (FAM or VIC). Amplification  
158 was performed in a 25 µl reaction volume, containing 50 ng of genomic DNA, 200 µM of  
159 each deoxynucleotide triphosphate, 1x Fast Start Taq DNA polymerase Buffer (Roche  
160 Applied Science, Mannheim, Germany), 1x GC-rich solution buffer (Roche Applied Science)  
161 and 1U of Fast Start Taq DNA polymerase (Roche Applied Science). The concentration of  
162 each pair of primers was 1.2 and 1.5 µM for the amplification of the CAG and GGN repeats,  
163 respectively. PCR conditions were: 30 cycles of 95°C for 45 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for  
164 30 sec for CAG amplification; 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 2 min and 72°C for 2 min  
165 for GGN amplification. Each PCR was initiated with a denaturation step at 95°C for 5 min



166 and terminated with an extension step at 72°C for 5 min. The PCR product was diluted 1:100  
167 in distilled water and 1 µl of the dilution was mixed with 10µl of formamide and 0.3 µl of  
168 GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, Warrington, UK), denatured at 98°C  
169 for 5 min and cooled on ice. Fragment separation was performed by automated capillary  
170 electrophoresis, using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the  
171 length was determined with Gene Scan Analysis Software (version 3.7) (Applied  
172 Biosystems). Internal standards supplied by the manufacturer were used for quality control.  
173 We blindly repeated the genotype analysis in 54 of the samples, and the results were  
174 completely coincident. The fragments size was confirmed by sequencing 48 DNA samples  
175 harboring different size alleles for both repeats by using the Big Dye Terminator Sequencing  
176 Kit (Applied Biosystem) at University of Las Palmas Sequencing Facility with excellent  
177 agreement between both procedures. Genotyping was performed specifically for research  
178 purposes based on the hypothesis that the aforementioned polymorphisms may influence  
179 MFO, leptin, osteocalcin, testosterone and fat mass. The researchers performing the  
180 genotyping were totally blinded to the subjects' identities.

### 181 *Statistical analysis*

182 All variables were checked for normal distribution using the test of Shapiro-Wilk. When  
183 necessary, the analysis was done on logarithmically transformed data. The influence of CAG  
184 and GGN repeat lengths on body composition, MFO, hormones and VO<sub>2</sub>max was determined  
185 taking CAG and GGN repeat lengths as either continuous variables or as dichotomous  
186 variables with allele cut-off thresholds. The relationship between CAG and GGN as  
187 continuous variables with body composition, hormones and physical fitness variables was  
188 examined using linear regression analysis. The longitudinal study was carried out with  
189 subjects belonging to the first (short repeat number) and fourth (long repeat number) quartile

190 of the CAG and GGN number distributions: CAG<sub>S</sub> (short  $\leq 19$  repeats), CAG<sub>L</sub> (long  $\geq 24$   
191 repeats), GGN<sub>S</sub> (short  $\leq 22$  repeats), and GGN<sub>L</sub> (long  $\geq 25$  repeats). Comparisons between  
192 short and long groups were carried out with ANOVA after accounting for age, height, total  
193 lean body mass, and VO<sub>2</sub>max as covariates. Lean mass was corrected for differences in height  
194 by dividing muscle mass by height<sup>2</sup><sup>46</sup>. Longitudinal effects were assessed with ANOVA for  
195 repeated measures after accounting for age, height, total lean body mass, VO<sub>2</sub>max, initial  
196 body fat mass, basal fat oxidation, time elapsed between the two measurements, and MFO as  
197 covariates. Stepwise multiple regression analysis was used to determine which variables had  
198 the highest predictive value for MFO.

199

## 200 **Results**

201 Body composition, basal energy expenditure, MFO, physical activity and fitness are reported  
202 in table 1. The distribution of AR allele frequencies for CAG and GGN repeat numbers are  
203 illustrated in Fig. 1. The median CAG repeat length was 21 (range: 13 -35), while the the  
204 GGN median length was 23 (range: 12 - 28). The median CAG and GGN values for short and  
205 long CAG groups were 17 26, respectively. The corresponding values for the GGN groups  
206 were 19 and 25, for the GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub>, respectively.

207

### 208 *CAG and MFO*

209 Although the CAG<sub>S</sub> subjects were 8 years older than their CAG<sub>L</sub> counterparts ( $P < 0.05$ ), both  
210 groups had similar body composition, even after accounting differences in age (Table 1). Not  
211 significant differences were observed between CAG groups in basal metabolic rate and  
212 maximal fat oxidation, even after accounting for the total lean body mass (Table 1). Likewise,

213 cardiorespiratory fitness ( $VO_2\max$ ), muscular fitness and daily energy expenditure were also  
214 comparable between groups (Table 1).

215

#### 216 *GGN and MFO*

217 The  $GNN_S$  group was 6 years older than their  $GGN_L$  ( $P<0.05$ ). Both groups had similar body  
218 composition and physical fitness (Table 1), even after adjusting for age and height (data not  
219 shown). When adjusting for age and height, the fat mass in the trunk region tended to be  
220 higher in the  $GNN_S$  compared to the  $GNN_L$  group ( $P=0.09$ ). There was also a trend for a  
221 higher MFO per kg of lower extremity lean mass in the  $GGN_L$  compared to the  $GGN_S$   
222 ( $P=0.06$ ) (Fig. 2A). There were no significant differences in basal metabolic rate or in MFO  
223 between GGN groups, even after accounting for age, height and  $VO_2\max$  as covariates.

224

#### 225 *Correlations*

226 A negative correlation was found between serum leptin and osteocalcin ( $r=-0.44$ ;  $p<0.05$ ).  
227 Leptin was positively correlated with whole body fat ( $r=0.56$ ;  $p<0.01$ ), while the correlation  
228 between osteocalcin and whole body fat was negative ( $r=-0.41$ ;  $p<0.05$ ). Similar associations  
229 were found between serum leptin and osteocalcin with fat mass in the trunk region ( $r=0.48$ ;  
230  $p<0.01$  and  $r=-0.35$ ;  $p<0.05$  respectively), and with the percentage of body fat ( $r=0.63$ ;  $p<0.01$   
231 and  $r=-0.44$ ;  $p<0.05$  respectively). A negative correlation was found between serum leptin and  
232 free testosterone ( $r=-0.43$ ;  $p<0.05$ ). Moreover, serum free testosterone was inversely  
233 correlated with percentage of body fat ( $r=-0.45$ ;  $p<0.05$ ).

234 The GGN repeat number tended to be negatively associated to the logarithm of serum  
235 leptin ( $r=-0.32$ ;  $p=0.07$ ), logarithm of percentage of body fat ( $r=-0.31$ ;  $p=0.08$ ), logarithmic of

236 fat mass in trunk region ( $r=-0.32$ ;  $p=0.07$ ), and positively associated to MFO per kg of lower  
237 extremity lean mass per height squared ( $r=0.31$ ;  $p=0.08$ ).

238

239 *Longitudinal study*

240 Longitudinal data were available for 17 and 19 subjects with extreme values for CAG and  
241 GGN genotypes, respectively. Their physical characteristics and body composition changes  
242 are depicted in Table 2. Body composition and  $VO_2$ max changed similarly in both groups  
243 during the follow up (Table 2). The CAG<sub>S</sub> and CAG<sub>L</sub> subjects accumulated  $3.4 \pm 5.1$  and  $2.0$   
244  $\pm 4.4$  kg of whole body fat over  $6.4 \pm 1.0$  years of follow up. This difference in fat mass  
245 accumulation was not statistically significant ( $P=0.49$ ) even after accounting for initial age,  
246 change in  $VO_2$ max, body height, initial body fat mass, basal fat oxidation and MFO as  
247 covariates.

248         The GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> subjects accumulated  $3.2 \pm 4.5$  and  $0.5 \pm 4.3$  kg of whole body  
249 fat over  $6.9 \pm 1.1$  years of follow up ( $P=0.13$ ) (Table 2). There was trend for a statistical  
250 difference in whole body fat mass accumulation after accounting for the initial percentage of  
251 body fat, height, and time elapsed between the two measurements ( $P=0.08$ ); the initial  
252 percentage of body fat, height, whole body basal fat oxidation, and time elapsed between the  
253 two measurements ( $P=0.08$ ); but not when adjusted for the initial percentage of body fat,  
254 height, MFO (absolute values), and time elapsed between the two measurements ( $P=0.11$ ); the  
255 initial percentage of body fat, height, MFO (per lean mass of the lower extremities), and time  
256 elapsed between the two measurements ( $P=0.12$ ), and the initial percentage of body fat,  
257 height and whole body basal fat oxidation, the differences (absolute values) in  $VO_2$ max, and  
258 time elapsed between the two measurements ( $P=0.25$ ).

259

260 The GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> subjects accumulated  $2.0 \pm 2.7$  and  $0.3 \pm 2.9$  kg of fat in trunk  
261 region over  $6.9 \pm 1.1$  years of follow up (GGN<sub>S</sub> vs. GGN<sub>L</sub>:  $P=0.19$ ) (Table 2). This difference  
262 was statically significant after accounting for the initial percentage of body fat, height and  
263 time elapsed between the two measurements ( $P<0.05$ ) (Fig. 2B); the initial percentage of body  
264 fat, height, whole body basal fat oxidation and time elapsed between the two measurements  
265 ( $P<0.05$ ); but not when adjusted for the initial percentage of body fat, height, MFO (absolute  
266 values), and time elapsed between the two measurements ( $P=0.07$ ), the initial percentage of  
267 body fat, height, MFO (per lean mass of the lower extremities), and time elapsed between the  
268 two measurements ( $P=0.08$ ), and the initial percentage of body fat, height and whole body  
269 basal fat oxidation, the difference (absolute values) in  $VO_{2max}$ , and time elapsed between the  
270 two measurements ( $P=0.20$ ).

271

#### 272 *Factors determining MFO*

273 Table 3 depicts the correlation matrix between MFO and fitness variables. The  $VO_{2max}$  (per  
274 kg of lower extremity lean mass:  $VO_{2max}$  Leg) explained 53% of the variance in MFO. In a  
275 stepwise multiple regression model with MFO per kg of lower extremities lean mass as  
276 dependent variable and  $VO_{2max}$  (per kg of lower extremity lean mass), logarithm of age, %  
277 of body fat and performance in 300 m as independent variables,  $VO_{2max}$  (per kg of lean mass  
278 of lower extremities) alone explained 52% of the variance in MFO, while the logarithm of age  
279 explained and additional 5%. The two other variables were excluded from the model ( $MFO =$   
280  $0.00017 \cdot VO_{2max}$  (ml/kg lean mass lower extremities) Leg -  $0.023 \cdot \log$  age (years) -  $0.022$ ,  
281  $R=0.77$ ,  $P<0.05$ ;  $n=32$ ).

282 In the whole group of subjects, the accumulation of fat tissue (whole body:  $r=-0.47$ ;  
283  $n=23$ ; and trunk region:  $r=-0.51$ ,  $n=23$ ) was associated to the changes in  $VO_{2max}$  (expressed

284 by kg of lower extremities lean mass). There was no significant relationship between MFO  
285 and whole body fat mass accumulation ( $r=-0.32$ ,  $P=0.15$ ,  $n=23$ ).

286

## 287 **Discussion**

288 This study shows that the CAG repeat polymorphism does not appear to be associated to fat  
289 mass in healthy young men, since subjects with short ( $\leq 19$ , 1st quartile) and long CAG ( $>23$ ,  
290 4th quartile) had similar fat mass and regional distribution of adipose tissue. This finding is  
291 further supported by a similar basal metabolic rate and maximal fat oxidation capacity, even  
292 after accounting for the total lean body mass in both CAG groups, as well as by the fact that  
293 both groups accumulated comparable amounts of fat tissue over the years. In contrast to our  
294 hypothesis, men in the first GGN repeat length quartile (i.e.,  $GGN \leq 22$ ) appear to have greater  
295 whole body and trunk fat mass than men pertaining to the fourth quartile ( $GGN > 24$ ). This  
296 concurs with a trend for a greater maximal fat oxidation capacity in the  $GGN_L$  group. These  
297 trends have been confirmed by the longitudinal study, showing lower trunkal fat mass  
298 accumulation in the  $GGN_L$  than in the  $GGN_S$  group.

299 In contrast with our hypothesis, we observed that CAG repeat length was not  
300 associated with whole body fat mass, its relative amount or its regional distribution, basal fat  
301 oxidation, maximal fat oxidation capacity or serum leptin concentration. These results concur  
302 with other studies where subjects in the first and fourth quartile for CAG length were  
303 compared<sup>33-34, 47</sup>. However, our results are in contrast with a previous study in 106 men from  
304 Germany, in which the CAG repeat length was associated with the percentage of body fat  
305 assessed with bioimpedance ( $r=0.27$ )<sup>21</sup>. Likewise, in young Danish men (20-29 years old), a  
306 weak ( $r=0.06$ ) but statistically significant association between the CAG repeat number and the  
307 percentage of body fat measured by DXA was reported<sup>22</sup>. The latter is at odds with the linear

308 relationship reported by Crabbe et al. between CAG number and free testosterone <sup>48</sup>, since  
309 higher levels of testosterone are usually associated with lower adiposity <sup>7-9</sup>. However, in  
310 agreement with previous studies in middle-aged <sup>49-50</sup> and aged men <sup>51</sup> no association between  
311 CAG or GGN length and free testosterone levels were observed in the present investigation.

312 In men with type 2 diabetes, a positive linear relationship between the CAG number  
313 and serum testosterone and leptin levels has been reported <sup>29</sup>. In agreement with our results,  
314 no association between CAG repeat number and visceral fat measured using Magnetic  
315 resonance imaging in 393 subjects was observed by Nielsen et al. <sup>22</sup>. Lack of association  
316 between serum testosterone and the percentage of body fat assessed with bioimpedance was  
317 also reported by Goutou et al. in 170 Greek men (mean age: 42) <sup>47</sup>. Consistent with our  
318 results, no association between CAG length and serum leptin levels have been reported by  
319 others <sup>52-53</sup>. Thus, in young men, the CAG repeat number has little or no impact in adiposity,  
320 with small differences between countries, which could be due to genetic and environmental  
321 differences.

322 As a novelty, we have clearly shown with cross-sectional and longitudinal data that the  
323 GGN repeat polymorphism has a role on maximal fat oxidation, body fat mass and its  
324 regional distribution. Our data indicate that a GGN<sub>L</sub> AR polymorphism protects against fat  
325 mass accumulation over the years. This result is supported by the higher MFO per kg of lower  
326 extremity lean mass found in the GGN<sub>L</sub> compared to the GGN<sub>S</sub> group, and by the trend for a  
327 positive association between the GGN number with the logarithm of the percentage of body  
328 fat, logarithm of fat mass in the trunk region and MFO per kg of lower extremity lean mass.  
329 Increased circulating androgen levels, besides the elevated MFO, could contribute to explain  
330 the lower accumulation of fat mass in the GGN<sub>L</sub> group. In fact, in the present investigation,  
331 free testosterone tended to be higher in the GGN<sub>L</sub> compared with GGN<sub>S</sub> group. In agreement,

332 greater serum concentration of total testosterone and free testosterone has been reported in  
333 GNN<sub>L</sub> than in the GGN<sub>S</sub> men<sup>54</sup>.

334 In agreement with our results, it has been reported that the main determinant of the  
335 maximal fatty acid oxidation capacity is the VO<sub>2</sub>max<sup>55</sup>. Interestingly, our longitudinal data  
336 reveal a positive association between the change in VO<sub>2</sub>max and the change in maximal fat  
337 mass oxidation capacity, indicating that an improvement in VO<sub>2</sub>max was associated with an  
338 increase in MFO and a reduction in whole body and trunk fat mass, and vice versa. However,  
339 in the present investigation, VO<sub>2</sub>max differences did not account for the association between  
340 GGN length and fat mass accumulation.

341

342 In conclusion, the CAG repeat polymorphism has little, if any, influence on leptin, fat  
343 mass and its regional distribution in healthy young men. In contrast, a long GGN polymorphic  
344 variant may protect from fat mass accumulation, particularly in the trunk region. This is in  
345 part explained by the higher maximal fat oxidation capacity of men with the longest GGN  
346 repeat polymorphism.

347



## 348 REFERENCES

- 349 1. Anubhuti, Arora S. Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes Metab* 2008; **10**: 973-  
350 93.
- 351 2. Bates SH, Myers MG, Jr. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function.  
352 *Trends Endocrinol Metab* 2003; **14**: 447-52.
- 353 3. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev*  
354 *Physiol* 2008; **70**: 537-56.
- 355 4. Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D *et al*. The suppressor of  
356 cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans.  
357 *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 3592-7.
- 358 5. Khaw KT, Barrett-Connor E. Lower endogenous androgens predict central adiposity in men. *Ann*  
359 *Epidemiol* 1992; **2**: 675-82.
- 360 6. Phillips GB, Jing T, Heymsfield SB. Relationships in men of sex hormones, insulin, adiposity, and risk  
361 factors for myocardial infarction. *Metabolism* 2003; **52**: 784-90.
- 362 7. Murras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K, Dokler M *et al*. Testosterone deficiency in young men:  
363 marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;  
364 **83**: 1886-92.
- 365 8. Rolf C, von Eckardstein S, Koken U, Nieschlag E. Testosterone substitution of hypogonadal men prevents  
366 the age-dependent increases in body mass index, body fat and leptin seen in healthy ageing men: results  
367 of a cross-sectional study. *Eur J Endocrinol* 2002; **146**: 505-11.
- 368 9. Woodhouse LJ, Gupta N, Bhasin M, Singh AB, Ross R, Phillips J *et al*. Dose-dependent effects of  
369 testosterone on regional adipose tissue distribution in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;  
370 **89**: 718-26.
- 371 10. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R *et al*. Sexual dimorphism in  
372 plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 579-84.
- 373 11. Wong SL, DePaoli AM, Lee JH, Mantzoros CS. Leptin hormonal kinetics in the fed state: effects of  
374 adiposity, age, and gender on endogenous leptin production and clearance rates. *J Clin Endocrinol Metab*  
375 2004; **89**: 2672-7.
- 376 12. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J *et al*. Evidence of free and  
377 bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J*  
378 *Clin Invest* 1996; **98**: 1277-82.
- 379 13. Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, Lehtonen A, Tilvis R, Tuomilehto J *et al*. Inverse correlation between  
380 serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 3243-6.
- 381 14. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene  
382 expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
383 2008; **105**: 5266-70.
- 384 15. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and  
385 markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 827-32.
- 386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399

- 400  
401 16. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U *et al.* Plasma osteocalcin is  
402 inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* 2009; **24**: 785-  
403 91.  
404
- 405 17. Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Chavarren J, Dorado C, Santana A *et al.* Strength  
406 training combined with plyometric jumps in adults: sex differences in fat-bone axis adaptations. *J Appl*  
407 *Physiol* 2009; **106**: 1100-11.  
408
- 409 18. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE *et al.* Endocrine regulation of male fertility by  
410 the skeleton. *Cell* 2011; **144**: 796-809.  
411
- 412 19. Yu IC, Lin HY, Liu NC, Wang RS, Sparks JD, Yeh S *et al.* Hyperleptinemia without obesity in male mice  
413 lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology* 2008; **149**: 2361-8.  
414
- 415 20. Lin HY, Xu Q, Yeh S, Wang RS, Sparks JD, Chang C. Insulin and leptin resistance with hyperleptinemia in  
416 mice lacking androgen receptor. *Diabetes* 2005; **54**: 1717-25.  
417
- 418 21. Zitzmann M, Gromoll J, von Eckardstein A, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen  
419 receptor gene modulates body fat mass and serum concentrations of leptin and insulin in men.  
420 *Diabetologia* 2003; **46**: 31-9.  
421
- 422 22. Nielsen TL, Hagen C, Wraae K, Bathum L, Larsen R, Brixen K *et al.* The impact of the CAG repeat  
423 polymorphism of the androgen receptor gene on muscle and adipose tissues in 20-29-year-old Danish  
424 men: Odense Androgen Study. *Eur J Endocrinol* 2010; **162**: 795-804.  
425
- 426 23. Guadalupe-Grau A, Ara I, Dorado C, Vicente-Rodriguez G, Perez-Gomez J, Cabrero JC *et al.* Osteocalcin as  
427 a negative regulator of serum leptin concentration in humans: insight from triathlon competitions. *Eur J*  
428 *Appl Physiol* 2010; **110**: 635-43.  
429
- 430 24. Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C, Olmedillas H, Fuentes T, Perez-Gomez J *et al.*  
431 Androgen receptor gene polymorphisms lean mass and performance in young men. *Br J Sports Med*  
432 2011; **45**: 95-100.  
433
- 434 25. Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor:  
435 mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 4043-54.  
436
- 437 26. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor  
438 are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin*  
439 *Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3777-82.  
440
- 441 27. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the  
442 human androgen receptor on androgen action. *The Prostate* 2005; **62**: 133-9.  
443
- 444 28. Wiren KM, Semirale AA, Zhang XW, Woo A, Tommasini SM, Price C *et al.* Targeting of androgen receptor  
445 in bone reveals a lack of androgen anabolic action and inhibition of osteogenesis: a model for  
446 compartment-specific androgen action in the skeleton. *Bone* 2008; **43**: 440-51.  
447
- 448 29. Stanworth RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH. Androgen receptor CAG repeat polymorphism is  
449 associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin in men with type 2 diabetes. *Eur J*  
450 *Endocrinol* 2008; **159**: 739-46.  
451
- 452 30. Rodriguez-Gonzalez G, Ramirez-Moreno R, Perez P, Bilbao C, Lopez-Rios L, Diaz-Chico JC *et al.* The GGN  
453 and CAG repeat polymorphisms in the exon-1 of the androgen receptor gene are, respectively,

- 454 associated with insulin resistance in men and with dyslipidemia in women. *J Steroid Biochem Mol Biol*  
455 2009; **113**: 202-8.
- 456
- 457 31. Skjaerpe PA, Giwercman YL, Giwercman A, Svartberg J. Androgen receptor gene polymorphism and the  
458 metabolic syndrome in 60-80 years old Norwegian men. *Int J Androl* 2010; **33**: 500-6.
- 459
- 460 32. Lapauw B, Goemaere S, Crabbe P, Kaufman JM, Ruige JB. Is the effect of testosterone on body  
461 composition modulated by the androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in elderly men? *Eur J*  
462 *Endocrinol* 2007; **156**: 395-401.
- 463
- 464 33. Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, von Eckardstein S, von Eckardstein A *et al.* The CAG  
465 repeat polymorphism in the AR gene affects high density lipoprotein cholesterol and arterial  
466 vasoreactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 4867-73.
- 467
- 468 34. Andersen ML, Guindalini C, Santos-Silva R, Bittencourt LR, Tufik S. Androgen Receptor CAG Repeat  
469 Polymorphism Is Not Associated With Erectile Dysfunction Complaints, Gonadal Steroids, and Sleep  
470 Parameters: Data From a Population-Based Survey. *J Androl* 2011; **32**: 524-9.
- 471
- 472 35. Solomon TP, Marchetti CM, Krishnan RK, Gonzalez F, Kirwan JP. Effects of aging on basal fat oxidation in  
473 obese humans. *Metabolism* 2008; **57**: 1141-7.
- 474
- 475 36. Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez JJ *et al.* Role of  
476 muscle mass on sprint performance: gender differences? *Eur J Appl Physiol* 2008; **102**: 685-94.
- 477
- 478 37. Sanchís-Moysi J, Idoate F, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Alayón S, Carreras A *et al.* The upper  
479 extremity of the professional tennis player: muscle volumes, inter-arm asymmetry and muscle fiber type  
480 distribution. *Scand J Med Sci Sports* 2009; **20**: 524-534.
- 481
- 482 38. Serrano-Sanchez JA, Delgado-Guerra S, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Arteaga-Ortiz R, Sanchis-Moysi J  
483 *et al.* Adiposity and age explain most of the association between physical activity and fitness in physically  
484 active men. *PLoS ONE* 2010; **5**: e13435.
- 485
- 486 39. Kim J, Wang Z, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Gallagher D. Total-body skeletal muscle mass: estimation  
487 by a new dual-energy X-ray absorptiometry method. *Am J Clin Nutr* 2002; **76**: 378-83.
- 488
- 489 40. Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Royo IA, Vicente-Rodriguez G, Ortiz RA *et al.* Effects of  
490 weight lifting training combined with plyometric exercises on physical fitness, body composition, and  
491 knee extension velocity during kicking in football. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; **33**: 501-510.
- 492
- 493 41. Medbo JJ, Tabata I. Anaerobic energy release in working muscle during 30 s to 3 min of exhausting  
494 bicycling. *J Appl Physiol* 1993; **75**: 1654-60.
- 495
- 496 42. Calbet JA, Chavarren J, Dorado C. Fractional use of anaerobic capacity during a 30- and a 45-s Wingate  
497 test. *Eur J Appl Physiol* 1997; **76**: 308-13.
- 498
- 499 43. Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat  
500 oxidation. *Med Sci Sports Exerc* 2002; **34**: 92-7.
- 501
- 502 44. Frayn KN. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol* 1983; **55**:  
503 628-34.
- 504
- 505 45. Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R *et al.* Alleles with short CAG and GGN  
506 repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *Int J Cancer* 2006;  
507 **118**: 1420-5.

- 508  
509 46. Lietzke MH. Relation between weightlifting totals and body weight. *Science* 1956; **124**: 486-7.  
510
- 511 47. Goutou M, Sakka C, Stakias N, Stefanidis I, Koukoulis GN. AR CAG repeat length is not associated with  
512 serum gonadal steroids and lipid levels in healthy men. *Int J Androl* 2009; **32**: 616-22.  
513
- 514 48. Crabbe P, Bogaert V, De Bacquer D, Goemaere S, Zmierzak H, Kaufman JM. Part of the interindividual  
515 variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and  
516 feedback set point: contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism. *J Clin  
517 Endocrinol Metab* 2007; **92**: 3604-10.  
518
- 519 49. Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M *et al*. Evidence that the CAG repeat  
520 in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in  
521 men. *J Endocrinol* 1999; **162**: 137-42.  
522
- 523 50. Stiger F, Brandstrom H, Gillberg P, Melhus H, Wolk A, Michaelsson K *et al*. Association between repeat  
524 length of exon 1 CAG microsatellite in the androgen receptor and bone density in men is modulated by  
525 sex hormone levels. *Calcif Tissue Int* 2008; **82**: 427-35.  
526
- 527 51. Van Pottelbergh I, Lumbroso S, Goemaere S, Sultan C, Kaufman JM. Lack of influence of the androgen  
528 receptor gene CAG-repeat polymorphism on sex steroid status and bone metabolism in elderly men. *Clin  
529 Endocrinol (Oxf)* 2001; **55**: 659-66.  
530
- 531 52. Lenz B, Heberlein A, Weinland C, Frieling H, Kornhuber J, Bleich S *et al*. Androgen receptor polyglutamine  
532 length does not influence serum levels of adipocytokines in alcoholism: a preliminary retrospective  
533 analysis. *Alcohol Alcohol* 2011; **46**: 214-6.  
534
- 535 53. Gonzalez Hernandez A, Cabrera de Leon A, Dominguez Coello S, Almeida Gonzalez D, Rodriguez Perez  
536 MC, Brito Diaz B *et al*. Serum resistin and polymorphisms of androgen receptor GAGn and GGNn and  
537 aromatase TTTAn. *Obesity (Silver Spring)* 2008; **16**: 2107-12.  
538
- 539 54. Bogaert V, Vanbillemont G, Taes Y, De Bacquer D, Deschepper E, Van Steen K *et al*. Small effect of the  
540 androgen receptor gene GGN repeat polymorphism on serum testosterone levels in healthy men. *Eur J  
541 Endocrinol* 2009; **161**: 171-7.  
542
- 543 55. Nordby P, Saltin B, Helge JW. Whole-body fat oxidation determined by graded exercise and indirect  
544 calorimetry: a role for muscle oxidative capacity? *Scand J Med Sci Sports* 2006; **16**: 209-14.  
545  
546  
547

**548 Acknowledgments**

549 The authors thank José Navarro de Tuero for his excellent technical assistance. This study  
550 was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56076-C06-04/ACTI) and  
551 FEDER, Gobierno de Canarias (PI2005/177), Proyecto Interreg IIIB BIOPOLIS, Fundación  
552 del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC), Cabildo de Gran Canaria, Cabildo  
553 de Tenerife and La Caja de Canarias, and Proyecto Estructurante “Integración de los grupos  
554 de investigación en Ciencias de la Salud”, ULPGC, Gobierno de Canarias. None of the  
555 authors has conflicts of interest. All financial sources have been reported.

**Table 1.** Body composition, anthropometrics, basal energy expenditure, fat oxidation, physical activity, and fitness in healthy men divided by extreme groups of androgen receptor polymorphisms: CAG<sub>S</sub>, CAG<sub>L</sub>, GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> (mean ± standard deviation).

	CAG <sub>S</sub>		CAG <sub>L</sub>		GGN <sub>S</sub>		GGN <sub>L</sub>	
		n		n		n		n
Age (years)	39.7 ± 6.4	9	31.4 ± 8.1*	14	37.9 ± 6.5	10	31.5 ± 7.4*	13
Height (cm)	176.0 ± 4.8	9	176.5 ± 5.7	14	176.2 ± 4.4	10	178.0 ± 6.6	13
Body mass (kg)	83.7 ± 13.4	9	81.3 ± 11.1	14	86.5 ± 10.3	10	82.8 ± 12.3	13
Percentage of body fat (%)	23.0 ± 6.6	9	19.7 ± 6.3	14	24.0 ± 4.1	10	19.6 ± 6.8	13
Body fat mass (kg)	19.8 ± 7.5	9	16.5 ± 7.3	14	21.0 ± 5.1	10	16.7 ± 7.6	13
Fat mass in the trunk region (kg)	10.4 ± 4.6	9	7.9 ± 4.0	14	11.0 ± 3.2	10	7.9 ± 4.2 †	13
Lean body mass (kg)	60.9 ± 6.9	9	61.6 ± 6.4	14	62.5 ± 6.6	10	63.0 ± 7.8	13
Lean mass arms (kg)	7.3 ± 1.1	9	7.4 ± 1.1	14	7.7 ± 0.9	10	7.6 ± 1.4	13
Lean mass legs (kg)	20.8 ± 2.6	9	20.4 ± 2.0	14	21.1 ± 2.3	10	21.2 ± 2.6	13
Lean mass extremities (kg)	28.1 ± 3.6	9	27.8 ± 3.0	14	28.8 ± 3.1	10	28.8 ± 3.9	13
Lean mass arms/HT <sup>2</sup> (kg·m <sup>-2</sup> )	2.3 ± 0.3	9	2.4 ± 0.3	14	2.5 ± 0.2	10	2.4 ± 0.4	13
Lean mass legs/HT <sup>2</sup> (kg·m <sup>-2</sup> )	6.7 ± 0.6	9	6.5 ± 0.4	14	6.8 ± 0.5	10	6.7 ± 0.7	13
Lean mass extremities/HT <sup>2</sup> (kg·m <sup>-2</sup> )	9.0 ± 0.8	9	8.9 ± 0.6	14	9.3 ± 0.7	10	9.1 ± 1.0	13
<b>Energy expenditure</b>								
Energy expenditure (Kcal·d <sup>-1</sup> )	2885 ± 1066	9	3241 ± 1281	10	2833 ± 1172	9	3656 ± 1733	10
Basal F <sub>ox</sub> (mg/min)	97.2 ± 33.1	9	87.0 ± 40.1	14	103.4 ± 32.2	10	98.6 ± 43.8	13
Basal F <sub>ox</sub> /LBM (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	1.6 ± 0.5	9	1.5 ± 0.7	14	1.7 ± 0.6	10	1.6 ± 0.8	13
Basal F <sub>ox</sub> /LML (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	4.7 ± 1.4	9	4.4 ± 2.2	14	5.0 ± 1.7	10	4.7 ± 2.2	13
Basal F <sub>ox</sub> /LML·HT <sup>-2</sup> (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	14.4 ± 4.5	9	13.4 ± 6.3	14	15.4 ± 5.3	10	14.8 ± 6.5	13
Basal energy expenditure (Kcal·min <sup>-1</sup> )	1541 ± 494	9	1433 ± 703	14	1375 ± 277	10	1361 ± 490	13
Basal energy expenditure/LBM (kcal·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	25.6 ± 9.6	9	23.4 ± 11.1	14	22.2 ± 4.9	10	21.6 ± 7.0	13
Maximal F <sub>ox</sub> (mg/min)	324.3 ± 117.4	9	366.2 ± 191.8	14	289.0 ± 91.3	10	389.3 ± 149.4	13
Maximal F <sub>ox</sub> /LBM (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	5.3 ± 2.0	9	5.9 ± 2.9	14	4.6 ± 1.3	10	6.1 ± 2.2	13
Maximal F <sub>ox</sub> /LML (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	15.8 ± 6.7	9	17.9 ± 9.3	14	13.6 ± 3.9	10	18.2 ± 6.4 †	13
Maximal F <sub>ox</sub> /LML·HT <sup>-2</sup> (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	48.6 ± 18.8	9	56.4 ± 30.7	14	42.4 ± 12.3	10	58.0 ± 22.2	13
Intensity of Maximal F <sub>ox</sub> (W)	81.9 ± 23.9	9	81.0 ± 25.0	14	75.2 ± 27.5	10	81.8 ± 21.3	13
<b>Maximal aerobic power</b>								
VO <sub>2</sub> max (l·min <sup>-1</sup> )	3.5 ± 0.4	9	3.7 ± 0.6	14	3.5 ± 0.6	10	3.7 ± 0.5	13
VO <sub>2</sub> max/Body mass (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	42.5 ± 8.4	9	45.7 ± 7.0	14	41.2 ± 6.9	10	45.0 ± 5.7	13
VO <sub>2</sub> max/LBM (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	57.5 ± 6.5	9	60.0 ± 7.9	14	56.9 ± 8.7	10	58.9 ± 6.5	13
VO <sub>2</sub> max/LML (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	169.6 ± 25.7	9	181.0 ± 24.3	14	168.4 ± 26.4	10	174.7 ± 17.0	13
HR <sub>max</sub> (bpm)	179.6 ± 8.7	9	187.2 ± 9.2	14	181.8 ± 9.8	10	182.9 ± 10.4	13
<b>Jumping tests</b>								
SJJH (m)	0.29 ± 0.05	9	0.28 ± 0.05	13	0.27 ± 0.04	9	0.30 ± 0.05	12
SJWmax/MML (w·kg <sup>-1</sup> )	170.4 ± 13.8	9	148.2 ± 66.4	14	150.2 ± 54.6	10	121.5 ± 85.6	13
CMJJH (m)	0.33 ± 0.03	8	0.34 ± 0.05	13	0.32 ± 0.03	9	0.35 ± 0.04	12
CMJWmax/MML (w·kg <sup>-1</sup> )	164.1 ± 65.0	9	159.3 ± 71.4	14	166.0 ± 61.6	10	130.3 ± 91.6	13
<b>Running tests</b>								
T30m (s)	4.6 ± 0.2	7	4.5 ± 0.3	9	4.6 ± 0.2	8	4.4 ± 0.2	10
T300m (s)	51.1 ± 5.1	9	47.2 ± 3.7	14	50.7 ± 5.0	10	48.3 ± 3.5	12

HT: height; LBM: lean body mass; LML: lean mass legs; F<sub>ox</sub>: fat oxidation; HR<sub>max</sub>: maximal heart rate; SJJH: jumping height in squat jumps; SJWmax/LML: maximal power in squat jumps per kg of lean mass of the legs (LML); CMJJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax/LML: maximal power in countermovement jumps per kg of lean mass in legs; T<sub>30m</sub> and T<sub>300m</sub> running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively. \* P < 0.05 compared with the short group inside of each AR polymorphism type. † P < 0.1 compared with short group inside of each AR polymorphism adjusting for age and height.

**Table 2.** Longitudinal data about body composition, physical characteristics and fitness in healthy men divided by extreme groups of AR: CAGs, CAG<sub>L</sub>, GGNs and GGN<sub>L</sub> (mean ± standard deviation).

	CAG <sub>S</sub> (n=7)		CAG <sub>L</sub> (n=10)			GGN <sub>S</sub> (n=9)		GGN <sub>L</sub> (n=10)				
	1 <sup>st</sup> Assessment	2 <sup>nd</sup> Assessment	1 <sup>st</sup> Assessment	2 <sup>nd</sup> Assessment	t	i	1 <sup>st</sup> Assessment	2 <sup>nd</sup> Assessment	1 <sup>st</sup> Assessment	2 <sup>nd</sup> Assessment	t	i
Age (years)	36.1 ± 4.4	42.0 ± 4.4	27.8 ± 8.3	34.6 ± 7.5	‡	ns	31.6 ± 7.2	38.0 ± 6.9	26.8 ± 6.9	34.2 ± 6.0	‡	‡
Body mass (kg)	81.2 ± 10.0	85.8 ± 12.4	76.8 ± 10.2	80.2 ± 12.7	*	ns	81.4 ± 8.2	86.1 ± 10.9	78.6 ± 13.3	81.7 ± 13.9	*	ns
Percentage of body fat (%)	22.3 ± 2.0	24.8 ± 4.6	18.1 ± 7.2	19.7 ± 6.1	ns	ns	21.8 ± 3.5	24.0 ± 4.4	18.3 ± 8.0	18.7 ± 6.7	ns	ns
Body fat mass (kg)	18.1 ± 2.6	21.6 ± 6.1	14.4 ± 7.3	16.4 ± 7.7	ns	ns	17.7 ± 3.1	20.9 ± 5.4	15.3 ± 9.3	15.8 ± 7.9	ns	ns
Fat mass in the trunk region (kg)	9.1 ± 1.3	11.3 ± 3.7	6.8 ± 4.1	7.9 ± 4.1	ns	ns	8.8 ± 2.2	10.8 ± 3.3	7.1 ± 5.2	7.3 ± 4.3	ns	ns
Lean body mass (kg)	60.1 ± 7.7	61.3 ± 7.3	59.2 ± 4.9	60.6 ± 6.4	ns	ns	60.6 ± 7.1	62.2 ± 6.9	60.3 ± 5.5	62.8 ± 8.6	ns	ns
Lean mass arms (kg)	6.9 ± 1.0	7.4 ± 1.2	6.5 ± 0.8	7.3 ± 1.0	ns	ns	6.8 ± 1.0	7.7 ± 0.9	6.8 ± 0.9	7.8 ± 1.6	ns	ns
Lean mass legs (kg)	20.6 ± 3.0	21.3 ± 2.4	19.8 ± 1.8	20.3 ± 2.2	ns	ns	20.4 ± 2.8	21.1 ± 2.4	20.3 ± 2.0	21.1 ± 2.9	ns	ns
Lean mass extremities (kg)	27.4 ± 3.8	28.7 ± 3.4	26.2 ± 2.4	27.6 ± 3.2	ns	ns	27.2 ± 3.6	28.8 ± 3.3	27.1 ± 2.7	28.9 ± 4.4	ns	ns
<b>Maximal aerobic power</b>												
VO <sub>2</sub> max (ml·min <sup>-1</sup> )	3.9 ± 1.0	3.4 ± 0.4	3.6 ± 0.7	3.5 ± 0.6	ns	ns	3.8 ± 0.8	3.5 ± 0.6	3.7 ± 0.7	3.6 ± 0.5	ns	ns
VO <sub>2</sub> max/Body mass (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	47.2 ± 7.8	39.8 ± 5.8	46.4 ± 6.3	44.3 ± 7.1	ns	ns	47.0 ± 6.6	40.8 ± 7.2	47.2 ± 7.5	44.8 ± 6.3	ns	ns
VO <sub>2</sub> max/LBM (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	63.7 ± 10.4	55.2 ± 4.9	59.8 ± 7.6	58.2 ± 8.6	ns	ns	63.3 ± 9.3	56.4 ± 9.0	60.8 ± 7.9	57.8 ± 7.1	ns	ns
VO <sub>2</sub> max/LML (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	187.1 ± 34.1	158.9 ± 11.6	179.2 ± 24.4	173.9 ± 24.4	ns	ns	188.7 ± 29.2	166.3 ± 27.1	180.7 ± 21.1	171.7 ± 18.2	ns	ns
	CAG <sub>S</sub> (n=7)		CAG <sub>L</sub> (n=10)			GGN <sub>S</sub> (n=9)		GGN <sub>L</sub> (n=10)				
Body fat mass accumulated (g/day)	1.51 ± 2.36		0.80 ± 1.80			1.41 ± 1.94		0.11 ± 1.65 P= 0.08				
Trunk fat mass accumulated (g/day)	0.93 ± 1.44		0.40 ± 1.14			0.88 ± 1.16		0.02 ± 1.12 †				
Lean body mass accumulated (g/day)	0.59 ± 0.87		0.59 ± 0.97			0.69 ± 0.72		0.88 ± 1.54				

LBM: lean body mass; LML: lean mass legs. \* P < 0.05 adjusting for time elapsed between the two assessments and initial height. ‡ P < 0.05 without adjusting for any variable. † P < 0.05 after accounting for the initial % of body fat, height and time elapsed between the two assessments. t= (time effect); i= interaction (time × group); ns = non significant.

**Table 3.** Relationship between CAG and GGN androgen receptor polymorphisms, leptin, osteocalcin, free testosterone, body composition and MFO.

	Leptin	Free testosterone	Osteocalcin	Percentage of body fat	Whole body fat	Trunk fat mass	Changes in VO <sub>2</sub> max·LML <sup>-1</sup>	MFO (g/min)	MFO/Kg LML·Ht <sup>-2</sup>	Lg of Leptin
Leptin		-0.43 *	-0.44 *	0.63 *	0.56 *	0.51 *	0.31	-0.22	-0.22	0.85 *
Free testosterone	-0.43 *		0.30	-0.45 *	-0.21	-0.23	-0.17	0.37 ‡	0.35	-0.51 *
Osteocalcin	-0.44 *	0.30		-0.44 *	-0.41 *	-0.34 ‡	-0.255	0.11	0.08	-0.43 *
Percentage of body fat	-0.63 **	-0.45 *	-0.44 *		0.96 **	0.94 **	0.40 ‡	-0.30 ‡	-0.35 ‡	0.74 **
Age	0.51 *	-0.62 **	-0.61 **	0.42 *	0.33 ‡	0.36 *	0.20	-0.61 **	-0.61 **	0.61 **
Number of CAG repeats	-0.15	0.29	0.001	-0.12	-0.08	-0.15	-0.34	0.12	0.13	-0.10
Number of GGN repeats	-0.23	0.21	0.27	-0.30 ‡	-0.23	-0.29 ‡	-0.25	0.30 ‡	0.31 ‡	-0.32 ‡
Total fat accumulated per day	0.17	0.11	-0.27	0.40 ‡	0.36 ‡	0.39 ‡	0.43 *	-0.28	-0.24	0.05
Trunk fat accumulated per day	0.13	0.11	-0.18	0.38 ‡	0.34 ‡	0.38 ‡	0.47 *	-0.25	-0.21	0.01
Energy expenditure (Kcal·kg LBM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	-0.12	-0.01	-0.018	-0.33 ‡	-0.35 *	-0.38 *	-0.17	0.48 **	0.55 **	-0.13
Lg of Lean body mass	-0.14	0.47 *	-0.026	0.08	0.33 ‡	0.32 ‡	0.31	0.46 *	0.31	-0.04

LBM: lean body mass; LML: lean mass legs; MFO: maximal fat oxidation; Ht: height; Lg: logarithm. ‡ P<0.1; \* P<0.05; \*\* P<0.01.

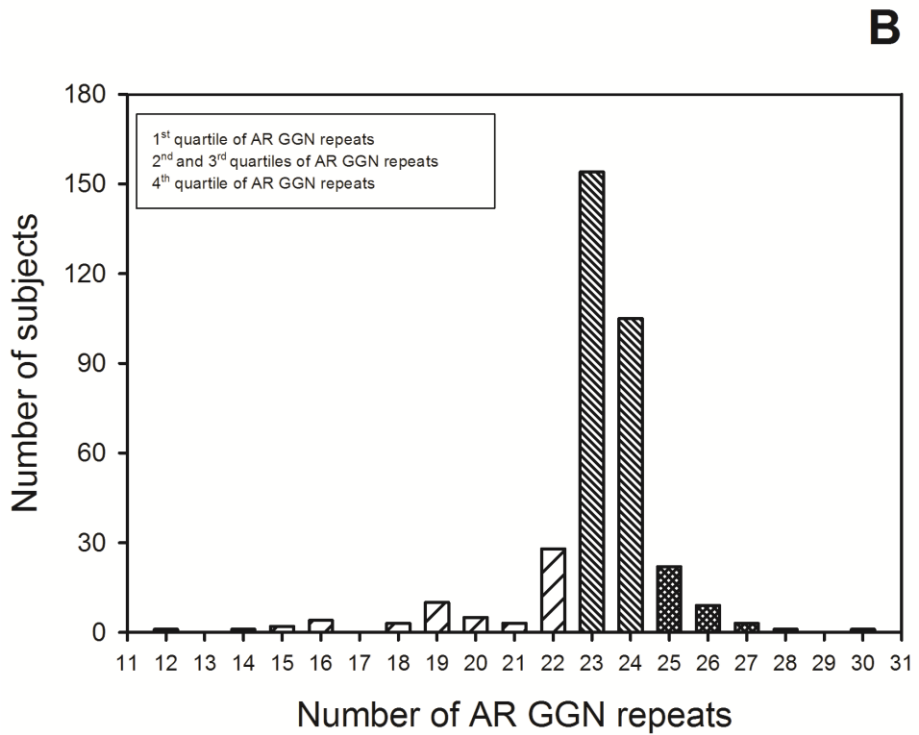
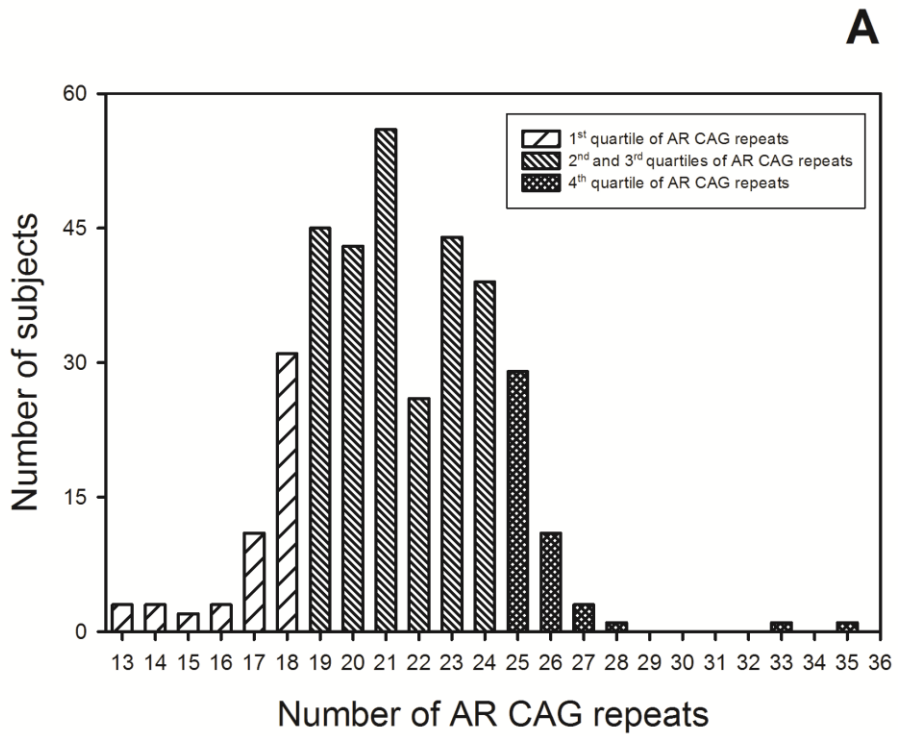


**Figure legends**

**Figure 1** Distribution frequency of the CAG (A) and GGN (B) repetition numbers separated by quartiles.

**Figure 2.** Maximal fat oxidation (MFO) of the GGN groups (A). Fat mass accumulated in the trunk region in ~7 years (B), after accounting for the initial percentage of body fat, height and time elapsed between the two measurements. \*  $P < 0.05$

**Figura 1:**



**Figura 2:**

