

40 Years of Research in Skeletal Muscle Plasticity; a Personal Account

HANS HOPPELER

Institute of Anatomy
University of Bern (Switzerland)

Abstract

The present review is a highly biased personal perspective on some of the research carried out over the last 50 years documenting the phenomena and the mechanisms of skeletal muscle tissue malleability. I will take a historical approach and follow some of the threads that have spurred my curiosity and have guided my research over my research career. This review is not exhaustive nor is it balanced. It represents my personal interests and some of the crucial findings that shaped my research agenda. I was lucky to conduct this research with many inventive collaborators that have done the major share of the actual research work. I have also been fortunate to have two outstanding mentors, E.R. Weibel and C.R. Taylor, who supported me throughout my research with advice guidance and, at least initially, with the necessary financial support. They have fostered a comprehensive approach and have taught me to combine functional and structural research to arrive at an integral view of system performance. When the appropriate molecular tools became available in the late 90ies, these helped start to unravel the mechanisms underlying the structural and functional plasticity of muscle documented previously. The insight that skeletal muscle tissue, when actively used is a major determinant of human physical well-being and health, continues to boost mechanistic research in muscle plasticity in the future.

Keywords: muscle, plasticity, mitochondria, capillary, VO_2max

Muscle as malleable tissue

Skeletal muscle tissue comprises some 40% of the human body mass. It is thus the most abundant of all human tissues. It is surprising that the mechanism of the most essential task of muscle, the capacity to contract and thus to perform mechanical work,

Quaranta anys de recerca sobre la plasticitat del múscul esquelètic. Conclusions personals

HANS HOPPELER

Institut d'Anatomia
Universitat de Berna (Suïssa)

Resum

Aquest és un estudi personal altament subjectiu sobre la recerca duta a terme durant els darrers cinquanta anys que documenta els fenòmens i els mecanismes de la plasticitat del teixit muscular esquelètic. Enfocaré el treball des d'una perspectiva històrica i seguiré alguns dels fils que han despertat la meua curiositat i han guiat la meua recerca al llarg de la meua carrera investigadora. Aquest estudi no és ni exhaustiu ni equilibrat. Representa els meus interessos personals i alguns descobriments crucials que han marcat els meus objectius d'investigació. He tingut la sort de dur a terme aquest estudi amb col·laboradors molt creatius que han estat els que han dut a terme la major part d'aquesta investigació. També he tingut la sort de comptar amb dos tutors excepcionals, E. R. Weibel i C. R. Taylor, el quals m'han donat suport durant tot el procés guiant-me i donant-me consells i, inicialment, facilitant-me l'ajuda econòmica necessària. Han fomentat un enfocament global i m'han ensenyat a combinar la recerca funcional i estructural per tal d'assolir una visió integral del rendiment del sistema. Quan les eines moleculars apropiades van passar a estar disponibles a finals dels noranta, aquestes van ajudar a descobrir els mecanismes subjacents de la plasticitat estructural i funcional del múscul prèviament descrita. La idea que el teixit muscular esquelètic actiu és determinant per al benestar físic i per a la salut continuarà impulsant la recerca mecanicista de la plasticitat muscular en el futur.

Paraules clau: múscul, plasticitat, mitocòndria, capil·lar, VO_2max

El múscul com a teixit mal·leable

El teixit muscular esquelètic comprèn al voltant del 40% de la massa corporal. És, per tant, el més abundant de tots els teixits humans. És sorprenent com el mecanisme de la tasca més essencial del múscul, la capacitat de contraure's i fer un treball mecànic, s'ha mantingut vague

remained elusive for a long time. Using electron microscopy, it was Huxley (1957) who established the “sliding filament” mechanism by which the mechanical phenomena of muscle contraction could be explained to satisfaction. What remained open at that time was whether the capacity to produce force could extrinsically be modified, i.e. whether skeletal muscle tissue was phenotypically malleable. While the malleability of human physical performance capacity was scientifically well established in the 50ies, as competently reviewed by Astrand (1956), the structural malleability of muscle tissue was not. Astrand (1956) noted that outstanding human performance, exemplified in outstanding feats of elite athletes, was the result of both natural endowment and specific exercise training, whereby it was assumed that central factors, such as cardiac output were sufficient to explain exercise induced changes of performance capacity.

While the malleability of human exercise performance was quite obvious and well documented, it remained unclear how, on the level of the skeletal muscle tissue, performance was modified by exercise training. There was a debate on whether muscle was an essentially unalterable tissue or whether exercise training could lead to detectable (structural) modifications explaining exercise training induced changes in muscle performance. While Russian scientists reported on increases of a number of enzyme activities such as hexokinase and succinate dehydrogenase after exercise training both in heart and skeletal muscle tissue (see Yakovlev, Krasnova, & Chagovets, 1963) other research of the time indicated that even prolonged exercise did not lead to muscle tissue enzyme modifications (Gould & Rawlinson, 1959; Hearn & Wainio, 1956).

The first study to unequivocally show massive changes in endurance capacity as well as in mitochondrial content of skeletal muscle tissue of growing rats after strenuous endurance training was published by Holloszy (1967). 6 weeks old male rats were run on a treadmill using an incremental exercise training program. Rats were run for 12 weeks, initially for 10 minutes at 22m per minute twice daily. At the end of the training period rats were run 120 minutes at 31m per minute with 12 sprints at 42m per minute lasting 20seconds. Holloszy (1967) found that the capacity to oxidize pyruvate of isolated mitochondria of gastrocnemius muscle of trained rats was essentially doubled

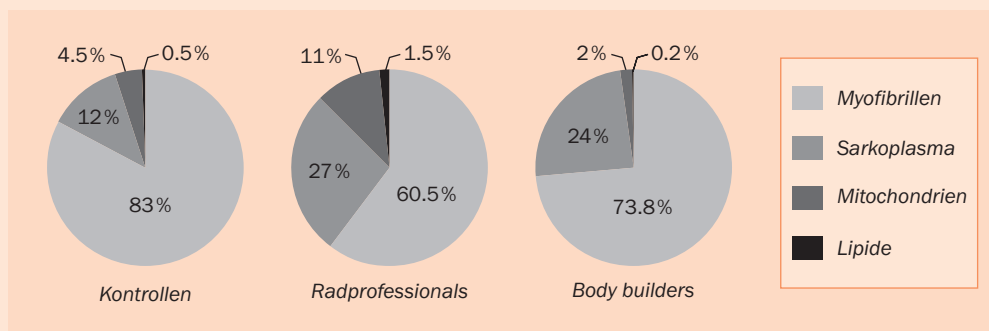
i imprecís durant tant de temps. A partir de la microscòpia electrònica, Huxley (1957) va establir el mecanisme del “filament lliscant”, el qual permet explicar satisfactòriament els fenòmens mecànics de la contracció muscular. El que va romandre sense resoldre en aquell moment va ser si la capacitat de produir força podia ser extrínsecament modificada, per exemple, si el teixit muscular esquelètic era fenotípicament modificable o no. Així com la modificació de la capacitat del rendiment físic humà va ser científicament establerta als anys cinquanta, tal com va descriure Astrand (1956), la plasticitat estructural del teixit muscular no ho va ser. Astrand (1956) va assenyalar que el rendiment humà excepcional, exemplificat per fites d'atletes d'elit, era el resultat tant del talent natural com de l'entrenament específic, per la qual cosa es va suposar que factors centrals com el cabal cardíac eren suficients per explicar els canvis en la capacitat de rendiment induïts per l'exercici.

Mentre que l'adaptabilitat del rendiment físic humà era bastant òbvia i estava ben documentada, va romandre confús com el rendiment era modificat per l'entrenament físic en el teixit muscular esquelètic. Es va iniciar un debat sobre la qüestió de si el múscul era un teixit essencialment inalterable o si, al contrari, l'entrenament físic podia dur a modificacions (estructurals) notables argumentat que l'exercici físic induïa canvis en el rendiment de la musculatura. Mentre que científics russos van constatar nombroses activitats enzimàtiques com l'hexocinasa i la succinat de deshidrogenasa després de l'exercici tant en el cor com en el teixit muscular esquelètic (Yakovlev, Krasnova, & Chagovets, 1963), altres investigacions d'aquell moment indicaven que fins tot l'exercici prolongat no conduïa a modificacions enzimàtiques en el teixit muscular (Gould & Rawlinson, 1959; Hearn & Wainio, 1956).

Holloszy (1967) va publicar el primer estudi que va mostrar de forma inequívoca canvis molt considerables en la capacitat de resistència, així com també en el contingut mitocondrial en el teixit muscular esquelètic de rates en creixement després d'un entrenament intens. Es va fer córrer rates mascles de sis setmanes en una cinta de córrer seguint un programa d'entrenament físic incremental. El programa va durar 12 setmanes, durant les quals les rates corrien 10 minuts a 22 metres per minut dos cops al dia. Al final del període d'entrenament, les rates corrien 120 minuts a 31 metres per minut amb 12 esprints de 20 segons a 42 metres per minut. Holloszy (1967) va descobrir que la capacitat d'oxidar el piruvat de mitocondris aïllades del múscul gastrocnemi de

along with the activities of oxidative enzymes such as cytochrome c reductase, succinate oxidase and cytochrome oxidase. As the concentration of cytochrome c was also found to be increased by a factor of close to 2, Holloszy (1967) proposed that the rise in activity of respiratory enzymes had to be due to an increase in mitochondrial protein. The ground-breaking study of Holloszy (1967) established once and for all the exceptional malleability of skeletal muscle tissue and pointed to mitochondria as being the essential structural entities subjected to bulk change with endurance exercise training. This study also indicated that it was necessary to use incremental strenuous exercise protocols to induce demonstrable structural modifications with exercise training. Not much later, Gollnick and King (1969) published a study in which rats were trained with forced running and mitochondria were analyzed with electron microscopy. The authors concluded that mitochondria in skeletal muscle of trained rats were significantly more numerous, appeared larger and with more densely packed cristae than mitochondria of control rats. They also reported that mitochondria and muscle fibers in rats run to exhaustion appeared to be swollen. This study confirmed the results of Holloszy (1967) by demonstrating with electron microscopy a volume change of the mitochondrial compartment as a consequence of endurance exercise training. However, there were a number of technical shortcomings which made these results qualitative rather than quantitative. The morphometric technique used to establish mitochondrial size and numerical density was inadequate as was the fixation of the muscle tissue. Gollnick and King used 1% osmium tetroxide in barbital acetate buffer at 350-400 mOsm. We later found this to be insufficient for muscle tissue and used higher osmolarity pre-fixation in glutaraldehyde (Hoppeler, Lüthi, Claassen, Weibel, & Howald, 1973).

rates entrenades es duplicava juntament amb les activitats dels enzims oxidatius com el Citocrom C reductasa, el Succinat oxidasa i el Citocrom oxidasa. Així la concentració de Citocrom C també va augmentar en un factor de quasi 2, Holloszy (1967) va concloure que aquest augment d'activitat dels enzims respiratoris es devia a un increment de les proteïnes mitocondrials. L'innovador estudi de Holloszy (1967) va establir finalment l'excepcional adaptabilitat del teixit muscular esquelètic i definia les mitocòndries com les entitats estructurals essencials subjectes a la modificació en massa amb l'entrenament físic de resistència. L'estudi també indicava que és necessari utilitzar protocols d'exercici intensos i incrementals per tal d'induir modificacions estructurals demostrables a partir de l'entrenament. Pocs anys més tard, Gollnick i King (1969) van publicar un estudi en el qual les rates eren entrenades i forçades a córrer i les mitocòndries eren mitjançant microscòpia electrònica. Els autors van concloure que les mitocòndries en els músculs esquelètics de rates entrenades eren significativament més nombroses, més grans i presentaven les crestes mitocondrials més denses que les mitocòndries de rates control. També van assenyalar que les mitocòndries i les fibres musculars de les rates que corrien fins a estar exhaustes apareixien inflamades. Aquest estudi va confirmar els resultats de Holloszy (1967), demostrant, mitjançant microscòpia electrònica, variacions del volum del compartiment mitocondrial com a conseqüència de l'entrenament físic de resistència. Malgrat això, hi va haver un seguit de llacunes tècniques que van fer d'aquests resultats fossin més qualitius que no quantitius. La tècnica morfològica utilitzada per mesurar la mida mitocondrial i la densitat numèrica era inadequada, així com també la fixació del teixit muscular. Gollnick i King van usar un 1% de tetròxid d'osmi en el tampó d'acetat barbital a 350-400 mOsm. Posteriorment, vam descobrir que aquestes condicions eren insuficients per al teixit muscular i van utilitzar una prefixació d'osmolaritat més alta en glutaraldehid (Hoppeler, Lüthi, Claassen, Weibel, & Howald, 1973).



◀ **Figure 1.** Distribution of key muscle components in controls, professional cyclists and body builders (redrawn from Hoppeler, 1986)

Figura 1. Distribució de components musculars clau en els controls de ciclistes professionals i culturistes (adaptat de Hoppeler 1986)

Shortly later Morgan, Cobb, Short, Ross, & Gunn (1971) subjected human volunteers to progressive one leg exercise on a bicycle ergometer 2 hours daily for one month. Muscle biopsies were analyzed biochemically and processed for electron microscopy. They found an increase in respiratory enzyme activities as well as in mitochondrial protein content. These changes were supported structurally by a 55% increase in the volume fraction of mitochondria; the latter established by classical stereological techniques.

Mitochondria and VO₂max

This was the research background 1971 when I was involved as a medical student in teaching exercise physiology labs at the Federal School of Physical Education (ESSM) in Magglingen, Switzerland. The director of its Research Institute was Hans Howald, who recently had learned taking muscle biopsies in Scandinavia from Bengt Saltin using the Bergstrom (1962) technique and needle.

Between the Research Institute and the Department of Anatomy of the University of Bern, led by Ewald R. Weibel, a research collaboration was set up (funded by Swiss National Science Foundation) to perform a state of the art stereological study of skeletal muscle tissue using biopsies processed for electron microscopy of trained and untrained subjects functionally characterized by a VO₂max test. The study comprised 18 subjects 6 of which belonged to the Swiss team of orienteers that had won the silver medal at the 1970 orienteering world championship. VO₂max ranged from 39 to 84 mlO₂/min x kg and as a main finding we could establish a highly significant correlation between the volume density of muscle mitochondria in biopsies of vastus lateralis and the VO₂max of the subjects. We also could establish that the mitochondria of trained subjects were structurally indistinguishable from mitochondria of untrained subjects in terms of cristae surface density and the volume fractions of the internal spaces (volume of matrix and inter-membrane space). Additional findings that did stand the test of time were that the trained subjects had a significantly larger fraction of their total mitochondria located in a subsarcolemmal position and that the volume fraction of intramyocellular lipids was

Una mica més tard, Morgan, Cobb, Short, Ross, & Gunn (1971) van sotmetre persones voluntàries a exercicis progressius amb una cama en una bicicleta estàtica dues hores al dia durant un mes. Es van fer biòpsies musculars i es van analitzar bioquímicament i es van processar per a una microscòpia electrònica. Es va trobar un increment en l'activitat d'enzims respiratoris, així com també en el contingut proteic mitocondrial. Aquests canvis van ser reforçats estructuralment per un increment del 55% en la fracció del volum de les mitocòndries; aquest últim va ser demostrat per tècniques estereològiques clàssiques.

Mitocòndries i VO₂max

Aquest era l'antecedent de l'estudi el 1971 quan, com a estudiant de medicina, ensenyava fisiologia de l'exercici a la Federal School of Physical Education (ESSM), a Magglingen, Suïssa. El director d'aquest Institut de Recerca era Hans Howald, que recentment havia après, amb Bengt Saltin a Escandinàvia, a obtenir biòpsies musculars mitjançant la tècnica Bergstrom (1962) amb agulla.

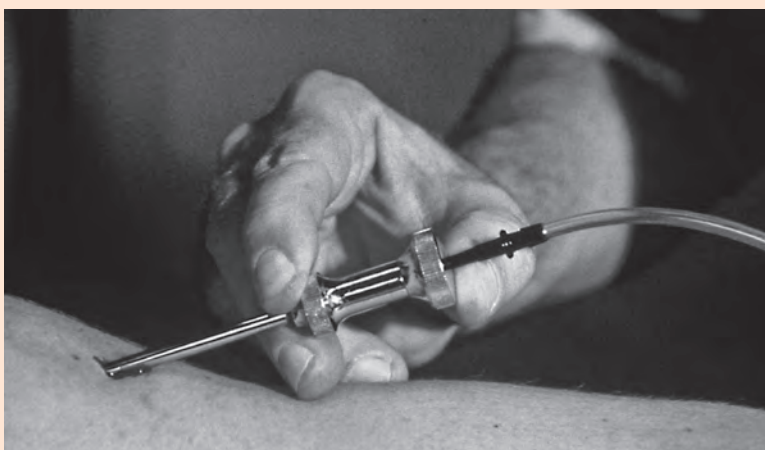
Entre l'Institut de Recerca i el Departament d'Anatomia de la Universitat de Berna, es va crear una col·laboració d'investigació dirigida per Ewald R. Weibel (finançada per la Swiss National Science Foundation) per tal de dur a terme estudis estereològics mitjançant microscòpia electrònica del teixit muscular esquelètic a partir de subjectes entrenats i no entrenats caracteritzats funcionalment per un test VO₂max. L'estudi comprenia 18 subjectes, 6 dels quals pertanyien a l'equip suís d'orientadors que havien guanyat la medalla de plata al campionat del món d'orientació el 1970. El VO₂max variava de 39 a 84 mlO₂/min x kg, i com a descobriment principal vam poder constatar una alta correlació entre la densitat del volum de les mitocòndries dels músculs en biòpsies de vastus laterals i el VO₂max dels subjectes estudiats. També vam poder constatar que les mitocòndries dels subjectes entrenats eren estructuralment indistingibles de les mitocòndries dels subjectes no entrenats pel que fa a la densitat de la superfície de les crestes i a les fraccions de volum dels espais interns (volum de la matriu i espai intermembranós). Els descobriments addicionals que han resistit el pas del temps van ser que els subjectes entrenats tenien una fracció significativament més gran del total de mitocòndries situades en una posició subsarcolemmàtica i que la fracció de volum dels lípids intramiocel·lulars era més del doble comparada amb la dels subjectes no entrenats. De manera

larger by more than two fold compared to untrained subjects. Overall this study led us to conclude that maximum oxygen intake was not only limited by the capacity of the cardiovascular system but also by the oxidative capacity of skeletal muscle mitochondria. This statement led to a year-long controversy about central vs. peripheral limitation (see below).

The 1973 study of VO_2 max and mitochondrial volume was (and still is) highly cited with the limitation of being correlative. After finishing my medical studies and after a three years engagement as an intern at a hospital I came back to the Department of Anatomy to engage in an academic career. One ambition was to verify the correlative results of our 1973 study in an interventional study and to further explore the relationship between mitochondria and oxygen consumption at the whole animal level. We carried out a 6 weeks training study in which 8 previously untrained subjects were trained 5 times weekly with a load eliciting 85-90% of the maximal heart rate for most of the training duration. This training intervention led to a 40% increase in mitochondrial volume of vastus lateralis muscle, a 33% increase in the load that we could maximally maintain during a training session and a 14% increase in VO_2 max. We could further confirm the preferential proliferation of subsarcolemmal mitochondria as well as a doubling of the intramyocellular lipid content (Hoppeler, Howald et al., 1985). Mitochondria were found to increase significantly in all

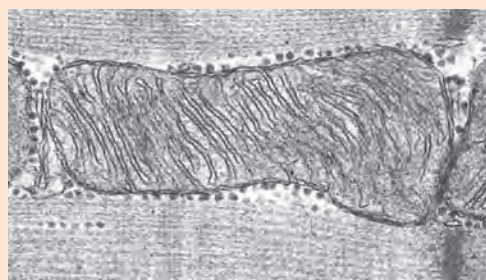
global, aquest estudi va portar a la conclusió que el volum màxim d'oxigen no estava únicament limitat per la capacitat del sistema cardiovascular, sinó també per la capacitat oxidativa de les mitocòndries dels músculs esquelètics. Aquesta afirmació va provocar una controvèrsia sobre la limitació central vs. perifèrica (vegeu a continuació), que va durar un any.

L'estudi de 1973 del VO_2 max i del volum mitocondrial va ser (i encara és) altament citat amb la limitació de ser correlatiu. Un cop acabats els meus estudis de medicina, i després de tres anys com a intern en un hospital, vaig tornar al Departament d'Anatomia per començar la meua carrera acadèmica. Una de les meves ambicions era verificar els resultats correlatius del nostre estudi de 1973 en un estudi d'intervenció i explorar en profunditat la relació entre les mitocòndries i el consum d'oxigen animal. Vam dur a terme un estudi d'entrenament de 6 setmanes en el qual 8 subjectes prèviament no entrenats van haver de seguir un entrenament 5 cops per setmana amb una càrrega entre el 85-90% de la freqüència cardíaca màxima durant la major part de l'entrenament. Aquest entrenament va causar un increment d'un 40% del volum mitocondrial en músculs vastos laterals, un increment del 33% de la càrrega màxima que podríem suportar durant una sessió d'entrenament i un increment del 14% del VO_2 max. Vam poder, a més confirmar la proliferació preferencial de mitocòndries subsarcolèmiques, així com la duplicació de lípids intramiocel·lulars (Hoppeler, Howald, et al., 1985). Es va comprovar que les mitocòndries s'incrementaven significativament en els tres tipus de fibres,



▲ **Figure 2.** Original picture of Bergstrom (Bergstrom 1962) needle as used in the 1973 study (Hoppeler, Lüthi et al. 1973) with rudimentary aseptic and protective measures. Typical of that time

Figura 2. Fotografia original de l'agulla de Bergstrom (Bergstrom, 1962) utilitzada en l'estudi de 1973, amb mesures d'asèpsia i de protecció rudimentàries (Hoppeler et al., 1973). Típic d'aquella època



▲ **Figure 3.** Micrograph of a mitochondrion in a longitudinal section of muscle tissue

Figura 3. Micrografia d'una mitocòndria en una secció longitudinal del teixit muscular

three fiber types, suggesting activation of all muscle fiber types in an exhaustive bout of endurance exercise carried out at some 20% of the maximal available sprint performance for the muscle involved (Howald, Hoppeler, Claassen, Mathieu, & Straub, 1985). These studies confirmed the massive short term plasticity of skeletal muscle tissue and pointed to the fact that local changes of oxidative capacity of muscle could be correlated to local functional changes (aerobic power output) but not immediately to global changes in $VO_2\text{max}$ that were found to be more modest.

During this time we carried out a large comparative study with the aim to characterize the design of the respiratory system by tracing the function and the structure of the pathway of oxygen from lungs to skeletal muscle mitochondria (Taylor, Karas, Weibel, & Hoppeler, 1987). In the context of this study all structural variables relevant for oxygen transfer from air to skeletal muscle mitochondria were quantitatively assessed using adequate stereological techniques for the lungs, the heart and the skeletal muscle tissue. The basic tenet of the study was that animals would build and maintain enough (but not more) structure on each step of the respiratory cascade to support maximal oxygen flux through all compartments (symmorphosis). We therefore estimated $VO_2\text{max}$ of a large number of mammalian species whereby $VO_2\text{max}$ was defined as the individually reproducible upper limit of oxygen consumption beyond which additional energy for locomotion was supplied anaerobically as evidenced by lactate accumulation in the circulation. Our analysis profited from the fact that it is generally accepted that under conditions of $VO_2\text{max}$ more than 95% of the oxygen flowing through the respiratory system would be consumed by mitochondria in active skeletal muscles and that thus, the oxygen flux through all the compartments of the respiratory system, from lungs to skeletal muscle mitochondria had to be equal. This afforded us with a tractable quantitative physiological model of the mammalian respiratory system.

In the experimental part of the study we estimated $VO_2\text{max}$ of species as small as the European woodmouse (body mass 16g) and as large as horses and steers (body mass 500kg). As $VO_2\text{max}$ was shown to increase with the 0.8 power of body mass (body mass dependent or allometric variation of $VO_2\text{max}$), this afforded us with a weight specific difference of $VO_2\text{max}$

la qual cosa suggereix una activació de tots els tipus de fibres musculars en un exercici exhaustiu de resistència dut a terme al 20% del rendiment màxim d'esprint possible pel múscul involucrat (Howald, Hoppeler, Claassen, Mathieu, & Straub, 1985). Aquests estudis van confirmar la gran plasticitat a curt termini del teixit muscular esquelètic i van assenyalar el fet que canvis locals de la capacitat oxidativa del múscul podrien estar correlacionats amb canvis funcionals locals (potència de sortida aeròbica), però no immediatament correlacionats amb canvis globals en el $VO_2\text{max}$, els quals van resultar ser més moderats.

Durant aquest temps he dut a terme un gran estudi comparatiu amb l'objectiu de caracteritzar el disseny del sistema respiratori fent un seguiment de la funció i l'estructura del recorregut de l'oxigen des dels pulmons fins a les mitocòndries dels músculs esquelètics (Taylor, Karas, Weibel, & Hoppeler, 1987). En aquest context, totes les variables estructurals rellevants per la transferència d'oxigen des de l'aire fins a les mitocòndries dels músculs esquelètics van ser examinades quantitativament utilitzant tècniques estereològiques adequades per als pulmons, el cor i el teixit muscular esquelètic. El principi bàsic de l'estudi era que els animals construïen i mantindrien suficients (però no més) estructures en cada fase de la cascada respiratòria per tal de suportar el màxim flux d'oxigen a través de tots els compartiments (simorfosi). Vam fer una estimació, per tant, del $VO_2\text{max}$ d'un gran nombre d'espècies mamíferes en les quals el $VO_2\text{max}$ era definit com el límit màxim de consum d'oxigen reproducible individualment més enllà del qual se subministrava anaeròbiamment energia addicional per a la locomoció, tal com evidencia l'acumulació de lactat en la circulació. La nostra anàlisi va treure profit del fet que generalment s'accepta que en situacions de $VO_2\text{max}$, més del 95% de l'oxigen circulant pel sistema respiratori seria consumit per les mitocòndries en músculs esquelètics actius i que, per tant, el flux d'oxigen a través de tots els compartiments del sistema respiratori, des dels pulmons fins a les mitocòndries dels músculs esquelètics, seria el mateix. Això ens va facilitar un model fisiològic quantitatiu tractable del sistema respiratori dels mamífers.

A la part experimental de l'estudi vam estimar el $VO_2\text{max}$ d'espècies tan petites com el ratolí de camp europeu (de massa corporal 16 g) i tan grans com els cavalls i els bous (de massa corporal 500 kg). Com que el $VO_2\text{max}$ augmenta amb la potència 0,8 de massa corporal (massa corporal dependent o variació al·lomètrica del $VO_2\text{max}$), això ens va proporcionar una diferència de pes específica del $VO_2\text{max}$

of approximately 6-fold between the smallest and the largest species. We further explored adaptive variation of $VO_2\text{max}$. This is the difference in $VO_2\text{max}$ of two species of similar body mass that exploit different lifestyles, i.e. sedentary vs. active. Adaptive variation of $VO_2\text{max}$ can be observed between horses and cattle or between dogs and goats and can amount to 2-3 fold differences in weight specific $VO_2\text{max}$. Thirdly, induced variation of $VO_2\text{max}$ is the difference in $VO_2\text{max}$ that can be induced by exercise training in an individual of one species. This difference is comparatively small, it is generally found that individual malleability of $VO_2\text{max}$ amounts to some 30% in a previously untrained individual.

Allometric and adaptive variation afforded us with sizeable differences in $VO_2\text{max}$ to which we could match differences of structural variables on each level of the respiratory cascade (Weibel, Taylor, & Hoppeler, 1991). On the level of the skeletal muscle tissue we were particularly interested in mitochondria, the organelles responsible for oxygen demand, and capillaries the organelles responsible for oxygen supply. Extensive and detailed morphometric studies indicated that, as previously found in trained and untrained humans, there were no structural differences in mammalian muscle mitochondria between active and inactive nor between the largest and the smallest species. Likewise, capillaries measured the same in all species analyzed. With regard to mitochondria, this indicated that mitochondrial volume was an adequate structural descriptor of muscle tissue oxidative capacity. In order to relate whole body $VO_2\text{max}$ to muscle mitochondrial volume, the total volume of mitochondria in the entire skeletal musculature had to be quantified. This was done by developing an adequate statistical sampling technique (Hoppeler, Lindstedt et al., 1984). The analysis of our data presented us with an unambiguous result. We found a direct proportionality of mitochondrial volume to $VO_2\text{max}$ over more than five orders of magnitude, with a slope of 1.01 and an r^2 of 0.994 (Hoppeler, 1990). This meant that not only mitochondrial structure – but also mitochondrial function at $VO_2\text{max}$ was invariant for all mammalian species with an oxygen consumption of some $5\text{mlO}_2/\text{ml}$ of mitochondria and minute (Hoppeler & Lindstedt, 1985). Athletic animals were found to reach their higher $VO_2\text{max}$ by two mechanisms. In athletic animals, skeletal muscle tissue is a larger fraction of body mass.

d'aproximadament 6 unitats entre l'espècie més petita i la més gran. Vam explorar amb més profunditat la variació adaptable del $VO_2\text{max}$. Aquesta és la diferència entre el $VO_2\text{max}$ de dues espècies de massa corporal similar amb diferents estils de vida, per exemple, sedentària versus activa. La variació adaptable del $VO_2\text{max}$ es pot observar entre cavalls i vaques o entre gossos i cabres, i pot arribar a diferències de 2-3 unitats en el $VO_2\text{max}$ específic del pes. En tercer lloc, la variació induïda del $VO_2\text{max}$ és la diferència en el $VO_2\text{max}$ que pot ser provocada per l'entrenament físic en un individu d'una espècie. Aquesta diferència és comparativament petita, i normalment es constata que la modificació individual del $VO_2\text{max}$ és de més del 30% en un individu prèviament no entrenat.

La variació al·lomètrica i adaptativa ens va proporcionar les considerables diferències en el $VO_2\text{max}$ a les quals vam poder igualar les diferències de les variables estructurals en cada nivell de la cascada del sistema respiratori (Weibel, Taylor, & Hoppeler, 1991). Pel que fa al teixit muscular esquelètic, estàvem particularment interessats en les mitocondries, orgànuls responsables de la demanda d'oxigen, i en els capil·lars, orgànuls responsables del subministrament d'oxigen. Extensos i detallats estudis morfològics van indicar, com s'havia comprovat prèviament, que en humans entrenats o no entrenats no va haver-hi diferències estructurals en les mitocondries dels músculs mamífers dels subjectes actius i inactius, ni entre les espècies d'animals de més o menys grandària. De la mateixa manera, els capil·lars tenien la mateixa grandària en totes les espècies analitzades. Respecte a les mitocondries, aquests resultats indicaven que el volum mitocondrial era un descriptor estructural adequat de la capacitat oxidativa del teixit muscular. A fi d'establir una relació entre el $VO_2\text{max}$ corporal i el volum mitocondrial muscular, es va haver de quantificar el volum total de les mitocondries en tota la musculatura. Això es va fer desenvolupant tècniques de proves estadístiques adequades (Hoppeler, Lindstedt et al., 1984). L'anàlisi de les nostres dades ens va donar un resultat inequívoc. Trobarem una proporcionalitat directa entre el volum mitocondrial i el $VO_2\text{max}$ amb una magnitud més de cinc vegades superior, amb un pendent d'1,01 i un R^2 de 0,994 (Hoppeler, 1990). Això significava que no només l'estructura mitocondrial, sinó també la funció mitocondrial en el $VO_2\text{max}$, era invariant per a totes les espècies de mamífers, amb un consum d'oxigen de $5\text{mlO}_2/\text{ml}$ per mitocondria i per minut (Hoppeler & Lindstedt, 1985). Els animals atlètics arribaven al seu màxim $VO_2\text{max}$ per dos mecanismes. El teixit muscular esquelètic en els animals atlètics representa una fracció major de la massa corporal. En els animals sedentaris, el teixit muscular esquelètic sol



► **Figure 4.**
Measuring VO_2 max in a
professional cyclist

Figura 4.
Mesurament del VO_2 max d'un
ciclista professional

In sedentary animals skeletal muscle tissue usually makes up less some 30% of body mass while in athletic animals it can be close to 50%. Additionally, the volume fraction of mitochondria per volume of muscle tissue is always larger in the athletic species.

What about humans? Judging by VO_2 max/body mass, humans must be considered to belong to the group of sedentary species. With $40\text{-}50\text{mlO}_2/\text{min} \times \text{kg}$ they group with sedentary goats and cattle and not with athletic dogs and horses ($>130\text{mlO}_2/\text{min} \times \text{kg}$). Plotting mitochondrial volume to VO_2 max indicates a 2-fold over-abundance of mitochondria in humans (Hoppeler, 1990). On the reasonable assumption that mitochondrial oxygen consumption is similar in humans as in all other mammalian species this apparent mismatch can be explained by the fact that (bipedal) humans can reach VO_2 max with a subset of their muscles (i.e. leg muscles), a feat not possible for quadrupedal animals.

Limitations to VO_2 max

Limitation to VO_2 max has been a hotly debated issue in exercise physiology for the last 50 years. The

ser menys d'un 30% de la massa corporal, mentre que en els animals atlètics pot arribar fins a 50%. A més a més, la fracció del volum de les mitocondries per volum de teixit muscular és sempre major en les espècies atlètiques.

I com funciona en els humans? Si es jutja per la proporció de VO_2 max en la massa corporal, els humans haurien de pertànyer al grup de les espècies sedentàries. Amb $40\text{-}50\text{mlO}_2/\text{min} \times \text{kg}$, havien d'estar en el grup d'animals sedentaris com les cabres i les vaques i no amb els gossos i els cavalls atlètics ($> 130\text{mlO}_2/\text{min} \times \text{kg}$). La representació gràfica de les dades del volum mitocondrial amb el VO_2 max va mostrar que en els humans hi havia una sobreabundància de mitocondries, més de 2 vegades (Hoppeler, 1990). Suposant lògicament que el consum d'oxigen mitocondrial dels humans és similar a totes les altres espècies de mamífers, aquesta aparent discrepància es pot explicar pel fet que els humans (que són bípedes) poden arribar al seu VO_2 max amb un subconjunt dels seus músculs (és a dir, músculs de les cames), que pels animals quadrúpedes és impossible d'aconseguir.

Límits del VO_2 max

En la fisiologia de l'exercici, saber quin és el límit del VO_2 max ha estat un tema molt debatut en els últims cinquanta

dominant opinion was oxygen delivery to the periphery by the heart was to be the only or at least the main bottleneck setting VO_2max in an individual. There were a several lines of evidence supporting a central limitation to VO_2max . In a hypothesis paper Gollnick and Saltin (1982) noted that "...the relative changes of (oxidative) enzymes in the skeletal muscle of man following endurance training greatly exceeds the elevation of VO_2max suggests that a direct cause and effect relationship does not exist between these variables." The notion that peripheral (mitochondrial) adaptations should match central (cardiac) adaptation was refuted in the training study published 1985 (Hoppeler, Howald et al., 1985). In this study we indeed found the change in mitochondrial volume density (+40%) much larger than the increase in VO_2max (+14%) but similar to the increase in power that the subjects could maintain maximally over a duration of 30min (+33%). We could thus calculate the amount of oxygen necessary to produce the extra power available to our subjects after exercise training ($1W = 2.99\text{mlO}_2/\text{min}$) and taking the efficiency of bicycling into account (0.21). It was found that the absolute change in VO_2max observed in the performance test accounted for the absolute change in maintained power. This indicated that a relatively small muscle mass produces the extra power output observed and hence shows a relatively large change in oxidative capacity compared to the small relative central adaptation.

An important clue for a central limitation of VO_2max is the possibility to manipulate VO_2max by manipulating the arterial oxygen content by withdrawal or by addition of red blood cells. In fact, and not surprisingly, in anemia, VO_2max declines in direct proportion to oxygen delivery (Lindstedt, Wells, Jones, Hoppeler, & Thronson, 1988). By contrast, increasing hematocrit above normal values, also increases VO_2max , a practice cherished by professional cyclists. That increasing oxygen delivery increases VO_2max is a strong argument in favor of a central limitation. However, looking more closely, Spriet, Gledhill, Froose and Wilkes (1986) found that blood transfusion of up to 3 units of blood in highly trained runners increased O_2 delivery by 30% but increased VO_2max by only 7% with oxygen extraction in the periphery falling from 90 to 75% (see Lindstedt & Conley 2001). Similar results were obtained by Turner et al. (1993) who also used re-transfusion of autologous blood in trained subjects

anys. L'opinió dominant era que l'alliberament d'oxigen del cor a la perifèria havia de ser l'únic marc o almenys el marc principal del VO_2max en un individu. Hi havia moltes evidències que demostraven una limitació central del VO_2max . En un assaig, Gollnick i Saltin (1982) van assenyalar que "... els canvis relatiu dels enzims (oxidatius) en el múscul esquelètic de l'home després d'un entrenament de resistència són molt superiors a la pujada del VO_2max , que suggereix que no hi ha una relació de causa directa a efecte entre aquestes variables." El concepte que les adaptacions perifèriques (mitocondrials) havien de coincidir amb l'adaptació central (cardíaca) va ser refutat en l'estudi de l'entrenament publicat el 1985 (Hoppeler, Howald et al., 1985). De fet, en aquest estudi descobríem un canvi de la densitat del volum mitocondrial (+40%), que era molt major que l'augment del VO_2max (+14%), però similar a l'augment de la potència màxima que els subjectes van poder mantenir durant més de 30 minuts (+33%). D'aquesta manera, vam poder calcular la quantitat d'oxigen necessària per produir la potència addicional que els subjectes tenien després d'haver entrenat ($1W = 2,99\text{ mlO}_2/\text{min}$), tenint en compte l'eficiència del ciclisme (0,21). Es va descobrir que el canvi absolut en el VO_2max observat en la prova del rendiment era el responsable del canvi absolut en la potència mantinguda. Això va indicar que una massa muscular relativament petita produeix la sortida de la potència addicional observada i per tant mostra un canvi relativament gran en la capacitat oxidativa en comparació amb l'adaptació central relativament petita.

Una pista important per a una limitació central del VO_2max és la possibilitat de manipular el VO_2max mitjançant la manipulació del contingut d'oxigen arterial a través de l'augment o la disminució de les cèl·lules vermelles. De fet, i com és lògic, en els casos d'anèmia, la disminució de VO_2max és en proporció directa a l'entrega d'oxigen (Lindstedt, Wells, Jones, Hoppeler, & Thronson, 1988). Al contrari, l'augment d'hematocrits per sobre dels valors normals també augmenta el VO_2max , que és una pràctica valorada pels ciclistes professionals. El fet que augmentar l'entrega d'oxigen augmenti el VO_2max és un argument evident a favor d'una limitació central. No obstant això, mirant més de prop, Spriet, Gledhill, Froose i Wilkes (1986) van trobar que la transfusió de fins a 3 unitats de sang en corredors altament entrenats augmentava l'alleberament de O_2 en un 30%, però el VO_2max va augmentar només en un 7% i l'extracció d'oxigen a la perifèria amb va disminuir un 90-75% (Lindstedt & Conley, 2001). Turner et al. (1993) van obtenir resultats similars utilitzant també retransfusions de sang autòloga en subjectes entrenats van trobar que la

and found the relationship between oxygen delivery and $\dot{V}O_2\text{max}$ to have a slope of significantly less than unity. The results of both studies indicate that at least in exercise with a large muscle mass, oxygen delivery can exceed the oxidative capacity of mitochondria.

The situation is reported to be different when only a small muscle mass is utilized such as in the human knee extensor model proposed by Andersen and Saltin (1985). When the entire cardiac output is available for the quadriceps muscle (2-3kg), blood flow may be as high as 2.5 l/min x kg. Under condition of regular cycling (15 kg of muscle active) blood flow is estimated at only 1 l/min x kg. Likewise peak O_2 is found to be some 350 ml O_2 /min x kg for the small muscle mass and 160 ml O_2 /min x kg for regular cycling (Richardson & Saltin 1998). Interestingly, these authors report that pO_2 in the femoral vein increases from less than 10mmHg with the low muscle mass to over 20 mmHg with the large muscle mass, indicating again inability of the periphery to make complete use of the oxygen delivery.

Overall, the available evidence suggests that each and every step in the oxygen transfer cascade can alter $\dot{V}O_2\text{max}$ individually under certain circumstances. However, overall and looking at mammals at large, a pattern of balance emerges such that structures for supply of oxygen are closely matched to oxygen demand ultimately driven by the energetic costs of locomotion. Additionally we find that some structures can vary in proportion to oxygen demand, mitochondria, capillaries, hemoglobin concentration, and cardiac size (i.e. stroke volume) within an animal's lifetime. Other structures apparently lack structural plasticity (lungs and the trachea) and must be built with sufficient capacity to accommodate use-induced increase in oxygen demand (Lindstedt & Conley, 2001).

Capillaries and mitochondria

Mitochondria and capillaries belong to the highly malleable structures of skeletal muscle tissue. It was Andersen (1975) who was the first to show in a longitudinal study that both capillary density as well as capillary to fiber ratio increased as an adaptation to exercise training and as a consequence of covering the increased oxygen demand. Spurred by this work we re-analyzed the biopsy material that we had col-

relació entre el subministrament d'oxigen i el $\dot{V}O_2\text{max}$ tenia una pujada significativament menor a la unitat. Els resultats d'ambdós estudis indiquen que almenys en exercicis en els quals intervé una gran massa muscular, el subministrament d'oxigen pot superar la capacitat oxidativa de la mitocòndria.

La situació és diferent quan el volum de massa muscular és petit, com és el cas de l'extensor del genoll, model proposat per Andersen i Saltin (1985). Quan tota la despesa cardíaca està disponible per al múscul del quàdriceps (2-3 kg), el flux de sang pot arribar a ser tan alt com 2,5 l/min x kg. Sota les condicions d'un pedaleig normal (15 kg múscul actiu) el flux de sang s'estima en només 1 l/min x kg. De la mateixa manera, el pic de O_2 és de 350 ml O_2 /min x kg per a una petita massa muscular i de 160 ml O_2 /min x kg en un pedaleig normal (Richardson & Saltin, 1995). Curiosament, aquests autors assenyalen que amb poca massa muscular el pO_2 menor 10 mmHg augmenta a més de 20 mmHg amb una gran massa muscular a la vena femoral la qual cosa indica una vegada més la incapacitat de la perifèria d'utilitzar l'oxigen alliberat.

En general, els resultats disponibles apunten que en determinades circumstàncies cada etapa de la cascada del transport de l'oxigen pot canviar el $\dot{V}O_2\text{max}$ individual. No obstant això, en termes generals, i mirant els mamífers en general, apareix un model d'equilibri de tal manera que les estructures per al subministrament d'oxigen estan molt adaptades a la demanda d'oxigen i són determinants del cost energètic de la locomoció. A més a més, trobem que algunes estructures poden variar en proporció a la demanda d'oxigen, les mitocòndries, els capil·lars, la concentració d'hemoglobina i la grandària cardíaca (és a dir, el volum sistòlic) durant el cicle de vida d'un animal. Altres estructures aparentment no tenen plasticitat estructural (els pulmons i la tràquea) i han de construir-se amb suficient capacitat per acomodar l'augment de la demanda d'oxigen provocat per l'ús. (Lindstedt & Conley, 2001).

Capil·lars i mitocòndries

Les mitocòndries i els capil·lars pertanyen a les estructures més modificables de teixit muscular esquelètic. En un estudi longitudinal, Andersen (1975) va ser el primer a demostrar que tant la densitat capil·lar com la ràtio de fibres capil·lars augmenten com una adaptació a l'entrenament físic i com a conseqüència de cobrir l'augment de la demanda d'oxigen. Estimulats per aquest estudi, decidírem analitzar novament les biòpsies que havíem recollit per a l'estudi

lected for the 1973 cross-sectional study on orienteers (Hoppeler, Lüthi et al., 1973) and did a stereological analysis of the capillary supply (Zumstein, Mathieu, Howald, & Hoppeler, 1983). Surprisingly we did not find the capillary density (number of capillaries / fiber cross-sectional area) in orienteers to be higher than in untrained men or women. However, we found a significant relationship between $VO_2\max$ and the CF ratio (number of capillaries / number of fibers). This ambiguous finding led us to an analysis of the stereological problems associated with estimating capillarity in muscle tissue (Mathieu, Cruz-Orive, Hoppeler, & Weibel, 1983). Stereology is a set of mathematical tools that allow for calculating structural parameters in 3 dimensions such as volumes, surfaces and lengths from their 2 dimensional representations on tissue sections. Stereological parameters have the beauty that they can be derived from first principles, something pretty unique in the biological sciences. The drawback of obtaining stereological (or morphometric) estimates in skeletal muscle tissue is related to the highly anisotropic nature of muscle. In muscle tissue *in vivo*, skeletal muscle fibers can be viewed as (infinitely) long, straight and parallel tubes with the capillaries wiggling along in the space between these tubes. However, this situation gets messy when muscle biopsies are analyzed: muscle fibers contract due to the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum; muscle fiber orientation is (partially) lost in the process of biopsy; and tissue shrinkage occurs through tissue fixation. This means that a number of desired parameters cannot be assessed accurately (i.e. in an unbiased fashion) in biopsies of human muscle tissue.

transversal dels esportistes de l'equip suís d'orientació (Hoppeler, Lüthi et al., 1973), i vam fer una anàlisi estereològica del subministrament capil·lar (Zumstein, Mathieu, Howald, & Hoppeler, 1983). Sorprenentment, la densitat capil·lar (nombre de capil·lars / secció transversal de fibres) en els esportistes de l'equip d'orientació no era major que la densitat en homes o dones no entrenats. No obstant això, trobàrem una relació significativa entre el $VO_2\max$ i la relació CF (quantitat de capil·lars / quantitat de fibres). Aquest descobriment ambigu ens va portar a una anàlisi dels problemes estereològics associats en l'avaluació de la capillaritat en el teixit muscular (Mathieu, Cruz-Orive, Hoppeler, & Weibel, 1983). L'estereologia és un conjunt d'eines matemàtiques que permeten calcular els paràmetres estructurals en 3 dimensions, tals com volums, superfícies i longituds des de les seves representacions en 2 dimensions en seccions del teixit. El que tenen de millor els paràmetres estereològics és que es poden derivar dels principis bàsics, quelcom bastant únic en les ciències biològiques. L'inconvenient d'obtenir estimacions estereològiques (o morfomètriques) en el teixit muscular esquelètic té a veure amb la naturalesa altament anisòtropa del múscul. En el teixit muscular *in vivo*, les fibres musculars esquelètiques apareixen com a tubs (infinitament) llargs, rectes i paral·lels, amb els capil·lars movent-se en l'espai entre aquests tubs. No obstant això, aquesta situació es complica quan s'analitzen biòpsies musculars: les fibres musculars es contreuen a causa de l'alliberament de calci des del reticle sarcoplàsmic; l'orientació de la fibra muscular es perd (parcialment) en el procés de la biòpsia i es produeix una contracció del teixit durant la fixació del teixit. Això significa que en les biòpsies del teixit muscular humà els paràmetres desitjats no es poden avaluar amb precisió (és a dir, d'una manera no esbiaixada).

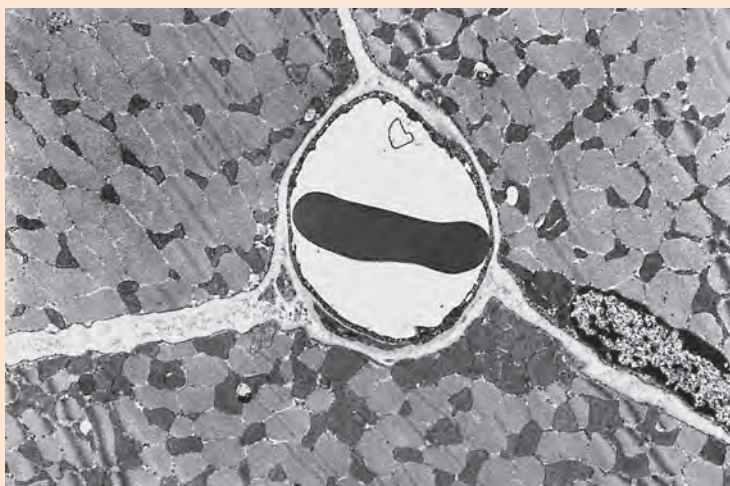


Figure 5
Micrograph of a muscle cross section including a capillary with an erythrocyte

Figura 5
Micrografia d'una secció transversal del múscul, inclòs un capil·lar amb un eritròcit

Arguably the most relevant parameter characterizing capillarity is capillary length. Given a relatively uniform capillary diameter, capillary length allows for calculation of capillary surface and capillary volume. With these variables some of the crucial boundary conditions for capillary exchange of oxygen and substrates can be calculated and implemented in physiological models. Capillary surface represents the available exchange interface between the capillary bed and the muscle fibers, while capillary volume with muscle blood flow determines the transit time available for capillary exchange under limiting conditions of VO_2max (Kayar et al., 1992).

Assuming capillaries to be straight and parallel to muscle fibers, capillary length could easily and efficiently be calculated from muscle cross-sections. The capillary length per unit volume of muscle tissue ($J_v(c,f)$; units: mm/mm^3) would then simply be equal to the capillary number per unit muscle cross-sectional area ($N_A(c,f)$; units: mm^{-2} or mm/mm^3). Calculating the total capillary length for an adult male human being with 30kg muscle mass we obtain the amazing value of some 15'000 km. However, as muscle capillaries are not straight tubes, but wiggling and interconnecting to some degree, this number has to be multiplied by a dimensionless factor of approx. 1.3 for human muscle biopsies. It is possible to obtain stereologically valid estimates of capillary length even in a partially anisotropic material as obtained when sampling muscle tissue with a biopsy needle. For this purpose one would need to take so-called IUR (independent uniform random) sections from muscle tissue blocks and use the basic stereological formula for estimating the length density of isotropic (un-oriented) structures. We have done this in a study aiming at estimating substrate fluxes in athletic and nonathletic species (Vock, Weibel et al., 1996). However, the IUR method is laborious and technically challenging and thus rarely used. It may also be noted in this context, that all classical estimates of muscle fiber cross-sectional area as reported in virtually all papers are biased towards too large cross-sectional areas. This because any section taken not perfectly perpendicular to the muscle fiber axis, will overestimate the fiber cross-sectional area.

Even using less than perfect stereological tools it is beyond doubt that endurance exercise training increases capillarity. However, the general consensus is

Es podria dir que el paràmetre més rellevant que caracteritza la capillaritat és la longitud capil·lar. Com que el diàmetre capil·lar és relativament uniforme, la longitud capil·lar permet el càlcul de la superfície capil·lar i del seu volum. Amb l'ús d'aquestes variables, es poden calcular i aplicar en models fisiològics algunes de les condicions crucials establertes per a l'intercanvi capil·lar de l'oxigen i dels substrats. La superfície capil·lar representa la interfície d'intercanvi disponible entre les fibres musculars i el llit capil·lar, mentre que el volum capil·lar amb el flux sanguini muscular determina el temps de trànsit disponible per a l'intercanvi capil·lar sota les condicions límit del VO_2max (Kayar et al., 1992).

Suposant que els capil·lars són rectes i paral·lels a les fibres musculars, la longitud capil·lar es pot calcular fàcilment i de manera eficient a partir d'unes seccions transversals del múscul. La longitud capil·lar per unitat de volum de teixit muscular ($J_v(c,f)$; unitats: mm/mm^3) seria llavors simplement igual al nombre de capil·lars per unitat d'àrea de la secció transversal del múscul ($N_A(c,f)$; unitats: mm^{-2} o mm/mm^3). Així, el càlcul total de la longitud dels capil·lars d'un home d'uns 30 quilos de massa muscular ens dóna un valor impressionant d'uns 15.000 km. No obstant això, com que els capil·lars musculars no són tubs rectes, sinó que es mouen i entrecomuniquen en un cert grau, aquest número ha de multiplicar-se per un factor adimensional d'aproximadament 1,3 per a les biòpsies musculars humanes. És possible obtenir estimacions estereològicament vàlides de la longitud capil·lar, fins i tot en un material parcialment anisotròpic, tal com es fa en la presa de mostres de teixit muscular amb una agulla de biòpsia. Per a això caldria prendre una mostra d'una secció IUR (independent, uniforme i a l'atzar) de blocs de teixit muscular i aplicar la fórmula estereològica bàsica per calcular la longitud de la densitat de les estructures isotròpiques (no orientades). Ho vam fer en un estudi amb l'objectiu d'estimar els fluxos de substrat en les espècies atlètiques i no atlètiques (Vock, Weibel et al., 1996). No obstant això, el mètode IUR és difícil laboriosament i tècnicament i per tant s'utilitza poc. En aquest context, es pot observar, també, que totes les estimacions clàssiques de la secció transversal de fibres musculars, descrites en pràcticament tots els estudis, estan esbiaixades cap a àrees de secció transversal massa grans. Això és degut a què, si una secció no és presa perfectament perpendicular a l'eix de la fibra muscular, els càlculs de la secció transversal de les fibres se sobrevaloraran.

Utilitzant eines estereològiques no tan perfectes, no queda cap dubte que l'entrenament de resistència augmenta la capillaritat. No obstant això, tots estan d'acord que l'augment

that the increase in capillary density is smaller than the increase in mitochondrial volume (Saltin & Gollnick, 1983). In comparative studies the reason for the smaller increase in capillaries, (characterizing oxygen supply) as compared to mitochondria (characterizing oxygen demand) could well be established (Conley, Kayar, & Rosler, 1987). While on the level of mitochondria, oxygen demand can be characterized completely with the structural variable "mitochondrial volume" such is not the case for capillaries. We could show that in athletic and sedentary animals of the same body mass (such as horses vs. steers or dogs vs. goats) a 2.5-fold difference in oxygen demand of the athletic species was met equally by a larger capillary supply and a larger hematocrit. It is not established completely which factors contribute in humans to match oxygen supply to oxygen demand with endurance training.

Substrate supply und oxygen flux

It is a well-established that human endurance exercise training not only increases $VO_2\text{max}$ but also increases the relative and the absolute amount of lipids oxidized during exercise. On the structural level this is reflected by the larger volume of intracellular lipids in trained endurance athletes (Hoppeler, Lüthi et al., 1973) and their increase with endurance training in interventional studies (Hoppeler, Howald et al., 1985). Intracellular lipids always occur as lipid droplets in contact with mitochondria (Vock, Hoppeler et al., 1996), it could thus be argued that the contact area between the lipid droplet and the mitochondrion could be one of the relevant parameter responsible for substrate selection in exercising muscle.

As discussed in some detail above, it is generally accepted that it is ultimately oxygen flux through the respiratory system and oxygen metabolism on the level of the mitochondria that determine $VO_2\text{max}$ of an individual. However, this is not an immediately obvious fact, as limitation could in principle just as well result from substrate limitation instead of oxygen limitation. We have carefully explored the possibility of substrate limitation in aerobic work using a comparative setting and comparing athletic dogs to sedentary goats (Taylor, Weibel et al., 1996). The species we analyzed differed by more than 2-fold in $VO_2\text{max}$. Maximum fat

de la densitat capil·lar és menor que l'augment del volum mitocondrial (Saltin & Gollnick, 1983). L'augment menor de capil·lars (que caracteritzen el subministrament de l'oxigen) en comparació amb les mitocòndries (que caracteritzen la demanda d'oxigen) ha estat ben establert en estudis comparatius (Conley, Kayar, & Rosler, 1987). Mentre que en les mitocòndries la demanda d'oxigen es pot caracteritzar completament amb la variable estructural "volum mitocondrial", aquest no és el cas dels capil·lars. Hem pogut demostrar que en els animals atlètics i sedentaris d'igual massa corporal (com els cavalls vs jònecs, o gossos vs cabres) una diferència de 2,5 vegades en la demanda d'oxigen de les espècies atlètiques es manifestava amb més capil·lars i hematocrits més elevats. En el cas dels humans, no s'han establert totalment quins són els factors que contribueixen perquè coincideixi el subministrament d'oxigen a la demanda d'oxigen amb l'entrenament de resistència.

Subministrament de substrat i flux d'oxigen

Sabem que l'entrenament de resistència humana no sols augmenta el $VO_2\text{max}$, sinó que també augmenta la quantitat relativa i absoluta dels lípids oxidats durant l'exercici. En el pla estructural, això es manifesta amb un volum més gran dels lípids intracel·lulars presents en els atletes de resistència entrenats (Hoppeler, Lüthi et al., 1973) i un increment en l'entrenament de resistència (estudis d'intervenció de Hoppeler, Howald et al., 1985). Els lípids intracel·lulars sempre s'observen en forma de gotetes de lípids en contacte amb les mitocòndries (Vock, Hoppeler et al., 1996). Per tant, es podria concloure que l'àrea de contacte entre les gotes de lípids i la mitocòndria podria ser un dels paràmetres rellevants en la selecció dels substrats en un múscul en exercici.

Com s'ha comentat anteriorment fil per randa, en general es considera que en última instància el flux de l'oxigen a través del sistema respiratori i el metabolisme de l'oxigen a nivell de les mitocòndries són els que determina el $VO_2\text{max}$ d'una persona. No obstant això, aquest no és un fet evident immediatament perquè la limitació en principi podria ser el resultat de la limitació del substrat en comptes de la limitació de l'oxigen. Hem estudiat amb atenció la possibilitat de limitació dels substrats en el treball aeròbic utilitzant la comparació dels gossos atlètics amb les cabres sedentàries (Taylor, Weibel et al., 1996). Es va trobar una diferència superior a dues vegades en el $VO_2\text{max}$ en les espècies analitzades. La màxima oxidació de greix es va produir en ambdues espècies a un 40%

oxidation occurred in both species at 40% of $VO_2\text{max}$ with most of the energy supplied by fat oxidation at low intensities. With exercise intensity increasing above 40%, carbohydrate oxidation supplied the additional energy, reaching maximal oxidation rates when the aerobic capacity was reached (Roberts, Weber, Hoppeler, Weibel, & Taylor, 1996). This fuel recruitment pattern seems to be general in mammals and applies to humans as well; Brooks and Mercier (1994) have used the term "crossover" concept to describe this concept of substrate utilization with increasing exercise intensity.

In a more detailed analysis and using adequate tracer techniques, we could establish that carbohydrate and lipid utilization from vascular sources is limited and reached at low exercise intensities (<40% of $VO_2\text{max}$; Weber, Roberts, Vock, Weibel, & Taylor, 1996; Weber, Brichon et al., 1996). This shortfall of fuel supply at higher exercise intensities is compensated for by an increased use of both intracellularly stored carbohydrates (glycogen) and lipids. These results are in good agreement with data on humans obtained using stable isotope techniques (Romijn et al., 1993). Together these data indicate that indeed transport and utilization of oxygen is the critical part in setting $VO_2\text{max}$ as the substrates, carbohydrates and lipids, are already in the muscle cell in immediate vicinity of the mitochondria. Vascular supply of substrates is not possible at any but the lowest exercise intensities. This also means that medium to high intensity exercise always exhausts intracellular substrate stores that then need replenishing during hours of rest.

Triggered by our comparative studies on the conditions for substrate utilization in athletic and sedentary species we got interested in the malleability of substrate utilization in human athletes (Vogt et al., 2003). We studied 11 duathletes that we subjected in a prospective random crossover design to 4 weeks of a high fat diet (53% of calories from fat) and 4 weeks of a low fat diet (<20% of calories from fat) separated by a washout period of 2 weeks. $VO_2\text{max}$ in an incremental exercise test and the half-marathon running time remained unchanged with both dietary periods. Likewise, mitochondrial and glycogen content of vastus lateralis remained unchanged. By contrast, the intramyocellular lipid content more than doubled and the respiratory exchange ratio dropped significantly

del $VO_2\text{max}$ amb la màxima part de l'energia subministrada per l'oxidació de greix en un entrenament a baixes intensitats. Amb l'augment de la intensitat de l'entrenament per sobre del 40%, l'energia addicional provenia de l'oxidació dels carbohidrats, i s'aconseguien nivells d'oxidació màxims quan s'aconseguia la capacitat aeròbica (Roberts, Weber, Hoppeler, Weibel, & Taylor, 1996). Aquest patró d'aprovisionament de combustible sembla general en els mamífers i s'aplica de la mateixa manera als humans; Brooks i Mercier (1994) han utilitzat el terme *intercanvi* per descriure aquest concepte de la utilització de substrats amb l'augment de la intensitat de l'exercici.

En una anàlisi més detallada utilitzant tècniques adequades amb indicis de localització, vam poder establir que la utilització d'hidrats de carboni i lípids que prové de fonts vasculars és limitada i aconsegueix el seu màxim amb un exercici a baixa intensitat (< 40% del $VO_2\text{max}$; Weber, Brichon et al., 1996; Weber, Roberts, Vock, Weibel, & Taylor, 1996). Aquest dèficit de reserves de combustible durant un entrenament d'alta intensitat es compensa per un augment en l'ús d'hidrats de carboni (glucogen) i lípids, emmagatzemats intracel·lularment. Aquests resultats corresponen a les dades obtingudes en humans utilitzant tècniques d'isòtops estables (Romijn et al., 1993). Totes aquestes dades indiquen que, efectivament, el transport i la utilització de l'oxigen és la part la determinació del $VO_2\text{max}$ i els substrats, ja que els hidrats de carboni i lípids estan en les cèl·lules musculars, al voltant de les mitocòndries. El subministrament vascular de substrats és possible només durant l'entrenament a intensitats baixes. Això també significa que l'entrenament de mitja o d'alta intensitat sempre exhaustiria les reserves intracel·lulars de substrats, que a continuació necessitarien recarregar-se durant les hores de descans.

Els nostres estudis comparatius sobre les condicions per a la utilització de substrats en les espècies atlètiques i sedentàries van promoure el nostre interès en la modificació de la utilització de substrats en atletes humans (Vogt et al., 2003). Es van estudiar 11 duatletes que van estar sotmesos durant 4 setmanes de manera aleatòria a una dieta alta en greixos (53% de calories de greix) i 4 setmanes a una dieta baixa en greix (<20% de calories de greix), separades per un període de 2 setmanes de neteja. El $VO_2\text{max}$ en un exercici d'intensitat progressiva i el temps de cursa de mitja maratón amb ambdós períodes dietètics es mantingueren invariables. De la mateixa manera, el contingut mitocondrial i el glucogen del múscul vast lateral es va mantenir sense canvis. Al contrari, el contingut de lípids intramiocel·lulars va augmentar més del doble i el quocient de l'intercanvi respiratori es va reduir de manera significativa la

indicating increased use of fat as substrates after the high-fat diet period. The increase in fat oxidation at rest was 35% while at 75% of VO_{2max} the increase of fat oxidation was still larger than 15%. This study showed that substrate selection of exercising muscle was also quite malleable and responded promptly to changes in dietary substrate composition.

Myofibrils and strength

Repeated low-load / high-repetitive “endurance” exercise leads to an increase in VO_{2max} , central adaptations such as an increased cardiac stroke volume and in the periphery to more mitochondria and capillaries in trained muscles. By contrast, high-load / low repetitive “resistance” training leads to a gain in muscle strength and muscle mass, but induces only minimal changes to the central systems responsible for oxygen supply. In order to characterize the structural specificity of strength training we carried a 6 week exercise training study on previously untrained subjects, using a comprehensive whole body training program (Lüthi et al., 1986). Strength of the knee extensor muscles increased by some 17% mostly during the first 3 weeks of the training intervention when the gain in muscle cross-sectional area (estimated by computed tomography) was minimal presumably due to neuronal adaptations. We saw a significant gain of 9% of quadriceps cross-sectional area mainly in the second part of the training period. Muscle biopsies indicated a relative decrease of mitochondrial volume density with an unchanged volume density of myofibrils. Calculating absolute myofibrillar and mitochondrial volumes indicated that the absolute volume of mitochondria remained unchanged while the absolute volume of myofibrils increased, accounting quantitatively for the gain in muscle volume (Hoppeler, 1986). Our results are broadly compatible with similar studies looking at strength training induced changes in human skeletal muscle tissue (see Abernethy, Jürimäe, Logan, Taylor, & Thayer, 1994; Folland & Williams 2007).

Mechanisms of muscle plasticity

The important aspect of all morphometric studies on muscle tissue adaptations with different training

qual cosa indicava un major ús del greix com a substrat després del període de la dieta alta en greixos. L'augment en l'oxidació de greixos en repòs va ser de 35%, mentre que el 75% del VO_{2max} l'augment de l'oxidació de greixos era encara major al 15%. Aquest estudi va mostrar que la selecció de substrats del múscul en exercici també era bastant modificable i responia ràpidament a canvis en la composició de substrats de la dieta.

Les miofibril·les i la força

Un exercici d'endurance amb càrregues baixes / moltes repeticions condueix a un augment del VO_{2max} , a adaptacions centrals com un augment del volum sistòlic i, en la perifèria, a un augment de les mitocòndries i dels capil·lars en els músculs entrenats. Al contrari, un entrenament de “resistència” amb càrregues altes / poques repeticions condueix a un augment de la força muscular i de la massa muscular, però provoca canvis mínims en els sistemes centrals responsables del subministrament d'oxigen. Amb l'objectiu de descriure l'especificitat estructural de l'entrenament de força, es va portar a terme un estudi d'entrenament de 6 setmanes sotmetent persones prèviament no entrenades a un programa d'entrenament complet de tot el cos (Lüthi et al., 1986). La força dels músculs extensors del genoll va augmentar un 17% sobretot durant les primeres 3 setmanes de l'entrenament, en quan l'augment de la secció transversal muscular (estimada per tomografia computeritzada) aquest va ser mínim, presumptament degut de les adaptacions neuronals. Vam observar un augment significatiu del 9% en la secció transversal del múscul quadríceps sobretot en la segona part del període d'entrenament. Les biòpsies musculars van indicar una disminució relativa de la densitat del volum mitocondrial i sense canvis en la densitat del volum de les miofibril·les. El càlcul absolut dels volums miofibril·lars i mitocondrials va indicar que el volum absolut de les mitocòndries es va mantenir sense canvis, mentre que el volum absolut de les miofibril·les es va incrementar, la qual cosa representa quantitativament un augment del volum muscular (Hoppeler, 1986). Els nostres resultats són molt compatibles amb estudis similars, per la qual cosa l'entrenament de força provoca canvis en el teixit muscular esquelètic humà (Abernethy, Jürimäe, Logan, Taylor, & Thayer, 1994; Folland & Williams 2007).

Els mecanismes de la plasticitat muscular

L'aspecte important de tots els estudis morfomètrics sobre les adaptacions del teixit muscular amb diferents

protocols resides in the clear message that training interventions lead to highly specific changes in muscle tissue composition. Endurance exercise training leads to an increase in structures involved in oxygen supply (capillaries) and oxygen demand (mitochondria). Additionally we generally see at least a tendency for a shift towards the slower muscle fiber types increasing muscle economy (Fitts & Widrick, 1996). Endurance training has no major effect on muscle volume, however muscle tissue composition is changed qualitatively on a timescale of weeks. As reported above, a 40% gain in mitochondrial volume can be observed in untrained subjects that take up a strenuous training schedule for 6 weeks. A 40% increase in mitochondria represents a prodigious synthetic feat for muscle tissue. As mitochondria consist of over 1000 different proteins both coded in the nucleus and in the mitochondrial genome this requires a massive coordinated regulation of the machinery involved in muscle maintenance. Likewise, we can ask the question as to how 10% myofibrillar growth can happen in muscle fibers as a consequence of a strength training intervention again of only 6 weeks duration. However, it was firmly established that functional performance changes after training interventions were quantitatively related to structural changes of the muscle tissue. Up and until about 1990, exercise physiology used essentially descriptive methods to map training induced phenotypic plasticity of skeletal muscle tissue. There were no tools available which allowed for exploring the link between the functional variables of the training intervention (duration, frequency, intensity of exercise) and the structural modifications explaining the functional improvements observed.

Molecular biology eventually provided the intellectual framework as well as the techniques that allowed for mechanistic analyses of training interventions. A whole array of tools became available that could analyze the flow of information (in the form of RNA) from the genetic material (DNA) in the nucleus to the machinery that produced the relevant structural proteins for mitochondria or myofibrils in muscle cells. It became necessary for exercise physiologists at that time to team-up with molecular biologists and to seek the links between the repeated stress of exercise sessions and the performance and structure changes observed as a consequence of these. Embracing molecular

protocols d'entrenament rau en el missatge clar que les intervencions en l'entrenament condueixen a canvis molt específics en la composició del teixit muscular. L'entrenament de resistència condueix a un augment de les estructures implicades en el subministrament d'oxigen (els capil·lars) i a la demanda d'oxigen (les mitocondries). A més a més, s'observa almenys una tendència d'utilització de les fibres musculars lentes que augmenten l'economia de la despesa muscular (Fitts & Widrick, 1996). L'entrenament de resistència no té un efecte important sobre el volum muscular; no obstant això, la composició del teixit muscular canvia de manera qualitativa en només unes poques setmanes. Tal com s'ha explicat anteriorment, es pot observar un augment de 40% del volum mitocondrial en subjectes no entrenats sotmesos a un programa d'entrenament intensiu de 6 setmanes. Un augment de 40% de les mitocondries representa un fet excepcional de síntesi del teixit muscular. Com que les mitocondries contenen més de mil proteïnes diferents codificades tant en el nucli com en el genoma mitocondrial, això requereix una massiva regulació coordinada de la maquinària implicada en el manteniment del múscul. Així mateix, ens podem preguntar com un creixement miofibril·lar de 10% pot tenir lloc en les fibres musculars com a conseqüència d'un entrenament de força en només 6 setmanes de durada. No obstant això, s'ha establert fermament que els canvis de rendiment funcional després dels períodes d'entrenament van ser relacionats quantitativament amb els canvis estructurals del teixit muscular. Fins 1990 aproximadament, la fisiologia de l'exercici utilitzava mètodes essencialment descriptius per descriure que l'entrenament provocava la plasticitat fenotípica del teixit muscular. No hi havia eines disponibles per poder estudiar la relació entre les variables funcionals de l'entrenament (durada, freqüència, intensitat de l'exercici) i les modificacions estructurals per explicar les millores funcionals observades.

Amb el temps, la biologia molecular va proporcionar el marc intel·lectual i també les tècniques que van permetre les anàlisis mecanicistes de l'entrenament. Tota una gamma d'eines estava disponible per analitzar el flux d'informació (en forma d'ARN) a partir del material genètic (ADN) en el nucli de la maquinària que produeix les proteïnes estructurals rellevants per a les mitocondries o miofibril·les en les cèl·lules musculars. En aquesta època els fisiòlegs de l'exercici havien d'unir-se i col·laborar amb els biòlegs moleculars i cercar les connexions entre l'estrès repetit de les sessions d'entrenament i el rendiment i els canvis estructurals observats. L'acceptació de la biologia molecular com a eina per comprendre la relació entre la pràctica de

biology as the tool to understand the link between exercise training and phenotypic adaptation of muscle tissue led to an explosion of knowledge on the basic response mechanisms of a living system to external stress. The ready availability of muscle tissue through biopsy samples as well as its well defined malleability made skeletal muscle tissue an ideal model to study gene expression in humans under defined experimental conditions.

We have identified 4 major stressors that muscle is subjected to whenever we choose to train (Hoppeler & Fluck, 2003). These primary stressors are mechanical load, metabolic disturbance, hormonal adjustments and neuronal activation; the latter leading to Ca^{++} shifts in activated muscle fibers. For resistance exercise training, the stress is dominantly mechanical, with the metabolic disturbances being small and of short duration. Likewise the hormonal and neuronal response to resistance training is completely different from that to endurance training. Endurance training involves low but long-term repeated mechanical stress. The metabolic disturbance in term of high lactate levels, low muscle pH and a massive energetic imbalance (i.e. increased

l'exercici físic i l'adaptació fenotípica del teixit muscular va originar una explosió de coneixements sobre els mecanismes bàsics de resposta d'un sistema viu a l'estrès extern. La disponibilitat del teixit muscular a través de mostres de biòpsia, així com la seva adaptabilitat ben definida van fer del teixit muscular esquelètic un model ideal per estudiar l'expressió gènica humana en condicions experimentals definides.

Vam identificar quatre estímuls principals als quals el múscul està sotmès cada vegada que entrenem (Hoppeler & Fluck, 2003). Aquests estressors principals del múscul són la càrrega mecànica, l'alteració metabòlica, els ajustos hormonal i l'activació neuronal; aquest últim provoca que el Ca^{++} canviï en les fibres musculars activades. En l'entrenament de resistència, l'estrès és predominantment mecànic, amb alteracions metabòliques petites i de curta durada. De la mateixa manera, la reacció hormonal i neuronal a l'entrenament de resistència és completament diferent de l'entrenament d'alta resistència. L'entrenament d'alta resistència consisteix en un repetit estrès mecànic de baixa càrrega però de llarga durada. L'alteració metabòlica en termes de nivells alts de lactat, pH baix del múscul i un desequilibri energètic massiu (és a dir, nivells d'AMP elevats) persisteix durant llargs períodes

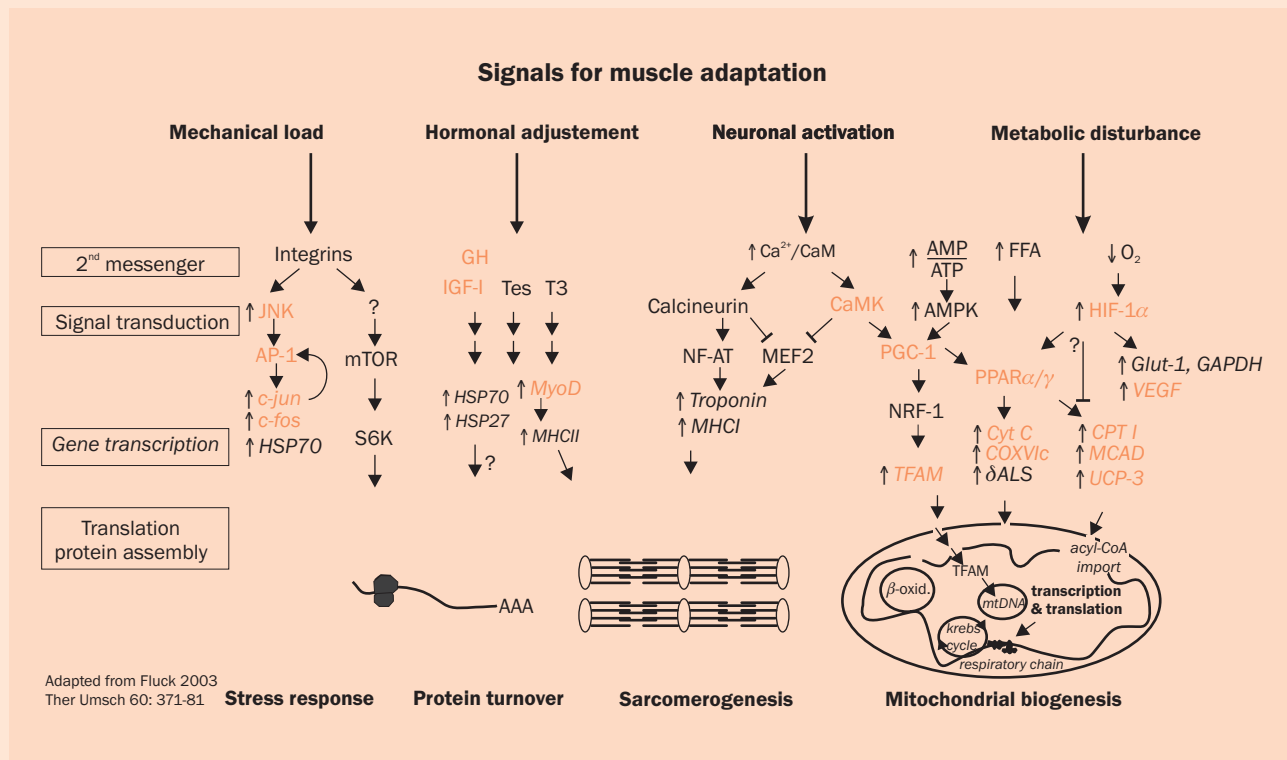


Figure 6. Primary muscle stressors (from Flüeck 2003)

Figura 6. Estressors musculars primaris (de Flüeck 2003)

AMP levels) persist over long time periods. These different stress patterns can be detected by the muscle fibers and are the reason for the distinct phenotypic plasticity we have described for these training modalities (see Hoppeler, Baum, Lurman, & Mueller, 2011 for details).

Endurance type exercise results in immediate and protracted signaling in skeletal muscles. Muscle fibers have a complex signaling network with multiple entry points. Signaling results essentially in a coordinated transcriptional up-regulation of a multitude of genes involved in the endurance response. This coordinated transcriptional up-regulation of structure genes leads to accretion of specific muscle proteins and enables muscle to perform better under endurance conditions. Exercise associated Ca^{2+} signaling as well as an altered skeletal muscle energy status, sensed by the AMPK (adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase) system seem to be the major input determinants for the signaling network. ROS/redox signaling as well as hypoxia sensing can modify and fine tune the muscle endurance response according to environmental cues and exercise intensities. The signaling process is further sensitive to substrate availability, whereby fatty acids use the PPAR system whereas muscle glycogen content can modulate AMPK signaling directly. Exercise related increases in circulating epinephrine levels seem to be important for the induction of angiogenesis. All regulatory pathways seem to converge on the transcriptional co-activator PGC-1 α which binds and activates multiple transcription factors and nuclear receptors. PGC-1 α helps chromatin remodeling thus facilitating transcription. PGC-1 α further interacts with the splicing machinery coordinating transcriptional as well as post-transcriptional processes. PGC-1 α can be seen as the major integrator of the transcriptional response of muscle tissue in response to endurance activity.

While phenotypic changes induced by endurance exercise training are mainly transcriptionally mediated, strength training mainly affects translation. The major integrator of multiple cascades used in strength training related signaling is mTOR (mammalian target of rapamycin). We can distinguish three major activators of mTOR. Growth factors such as insulin and growth hormone act through the IGF-R (insulin receptor) – Akt

de temps. Aquests patrons d'estrès diferents poden ser detectats per les fibres musculars i són la raó de la plasticitat fenotípica distinta que hem descrit per a aquestes modalitats d'entrenament (vegeu Hoppeler, Baum, Lurman, & Mueller, 2011 per a més detalls).

L'entrenament d'alta resistència dóna com a resultat la senyalització immediata i prolongada en els músculs esquelètics. Les fibres musculars tenen una xarxa de senyalització complexa amb múltiples punts d'entrada. La senyalització dóna com a resultat principalment una suprarregulació transcripcional coordinada d'una multitud de gens implicats en la resposta a aquest tipus d'entrenament. Aquesta regulació coordinada transcripcional dels gens estructurals condueix a l'acumulació de proteïnes musculars específiques i permet un millor rendiment del múscul quan està sotmès a condicions d'alta resistència. La senyalització de Ca^{2+} associada a l'exercici, així com el canvi de l'estat d'energia del múscul, detectat pel sistema de l'AMPK (adenosine-5' protein monophosphate-activated protein kinase), semblen ser els principals determinants de la xarxa de senyalització. La senyalització ROS/redox i la detecció d'hipòxia poden modificar i ajustar la resposta del múscul a la resistència en funció dels senyals ambientals i la intensitat de l'exercici. El procés de senyalització és, a més a més, sensible a la disponibilitat del substrat, per mitjà del qual els àcids grassos utilitzen el sistema PPAR, mentre que el contingut de glucogen muscular pot modular la senyalització d'AMPK directament. L'augment dels nivells d'adrenalina circulant lacionats amb l'exercici semblen ser importants per a la inducció de l'angiogènesi. Totes les vies de regulació semblen convergir cap al coactivador transcripcional PGC-1 α que s'uneix i activa diversos factors de transcripció i receptors nuclears. El PGC-1 α ajuda a la remodelació de la cromatina facilitant d'aquesta manera la transcripció. El PGC-1 α interactua, a més a més, amb mecanismes d'*splicing* i coordinen els processos de transcripció així com els de posttranscripció. Podem considerar el PGC-1 α com el principal integrador de la reacció transcripcional del teixit muscular en resposta a una activitat de resistència.

Mentre que els canvis fenotípics provocats per l'entrenament de resistència són principalment intervinguts amb la transformació, l'entrenament de força afecta principalment la maquinària. El principal integrador de les múltiples cascades utilitzades en la senyalització de l'entrenament de força és mTOR (mammalian target of rapamycin). Podem distingir tres grans activadors de mTOR. Els factors de creixement com la insulina i l'hormona del creixement actuen a través

(Protein kinase B, PKB) pathway. Mechanical stress signals activate Akt dependent and Akt independent pathways. Nutritional cues such as the presence of leucine and other amino acids are directly sensed by mTOR. mTOR increases protein synthesis, both through translation initiation and elongation. In strength signaling there are also negative regulators of mTOR. A low cellular energy status decreases mTOR activation. Myostatin as a major muscle pro-cachectic factor represses mTOR directly and indirectly. Protein synthesis dependent hypertrophic growth of skeletal muscle tissue is limited by nuclear domain size. Fiber growth beyond 20% is thus supported by recruitment of satellite cells. Satellite cells can be activated by a number of growth factors (i.e. FGF; HGF, BMP etc.) as well as the myogenic regulatory factors MyoG (myogenin) and MyoD (myogenic differentiation factor). Chronic low-level elevation of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 are strong repressors of the Akt-mTOR signaling cascade and of myogenic regulatory factors. Androgens seem to interfere with multiple signaling pathways and enhance muscle cellular metabolism as well as muscle growth. Overall muscle phenotypic plasticity with strength type exercise training is regulated mainly by mTOR and its effects on the translational machinery in muscle fiber as well as the activation of satellite cells; representing DNA recruitment to muscle cells.

Overall, the last 25 years of molecular research into the molecular mechanisms involved in producing the training response have been extremely productive. The regulatory networks for endurance and strength training have been explored and major players have been identified. We now know that endurance exercise works mainly through transcriptional modulation while strength training works through regulation of translation. Both networks are massively complex, with multiple entry points, with many parallel signaling strands, with interconnections as well as with feed-forward and feed-back loops. These signaling networks are extremely robust and difficult to experimentally tease apart. For the latter it is necessary to use model systems such as transgenic animals and cell cultures that can be appropriately modified. The sheer complexity of the regulatory network that control phenotype in muscle fibers is awe inspiring and we can be certain that we are far from having a complete grasp of it.

de la via IGF-R (insulina-receptor) - Akt (proteïna-cinasa B, PKB). Els senyals d'estrès mecànic activen vies dependents i independents de l'Akt. Senyals nutricionals com la presència de leucina i altres aminoàcids actuen directament sobre mTOR. mTOR augmenta la síntesi de proteïnes mitjançant les fases d'iniciació i elongació del procés de traducció. En la senyalització de la força hi ha també reguladors negatius de la mTOR. Nivells cel·lulars energètics disminueix l'activació de mTOR. La miostatina, com a important factor procaquètic del múscul, reprimeix la mTOR directament i indirectament. El creixement hipertròfic de teixit muscular que depèn de la síntesi de les proteïnes està limitat per la grandària del domini nuclear. El creixement de la fibra més enllà de 20% és possible amb la implicació de les cèl·lules satèl·lit. Les cèl·lules satèl·lit poden ser activades per nombrosos factors de creixement (FGF, HGF, BMP, etc.), així com per factors de regulació miogènica MyoG (*myogenin*) i MyoD (factor de diferenciació miogènica). L'augment crònic del baix nivell de citocines inflammatòries, com la TNF- α i la IL-6, són forts repressors de la cascada de senyalització de Akt-mTOR i dels factors de regulació miogènica. Els andrògens semblen interferir en les múltiples vies de senyalització i millorar el metabolisme cel·lular muscular i també el creixement muscular. Generalment a plasticitat muscular fenotípica general en l'entrenament de força està regulada principalment per la mTOR i afecta sobre la maquinària de transformació en la fibra muscular, així com l'activació de les cèl·lules satèl·lit que representa el reclutament d'ADN en les cèl·lules musculars.

En general, els últims vint-i-cinc anys d'investigació molecular dels mecanismes moleculars implicats en la resposta a l'entrenament han estat molt productius. S'han explorat les vies reguladores de resposta a l'entrenament de resistència i de força i s'han identificat els principals protagonistes. Avui sabem que l'exercici de resistència funciona principalment a través de la modulació transcripcional, mentre que l'entrenament de força funciona a través de la regulació de la transformació. Ambdues vies són extremament complexes, amb múltiples punts d'entrada, amb moltes cadenes de senyalització paral·leles, amb interconnexions i també amb circuits de prealimentació i de retroalimentació. Aquestes xarxes de senyalització són molt robustes i difícils de distingir experimentalment. Per a aquests experiments és necessari l'ús de sistemes model com animals transgènics i conreus cel·lulars que es poden modificar adequadament. L'enorme complexitat de la xarxa de regulació que controla el fenotip en les fibres musculars és un fet, i estem lluny de comprendre-la completament.

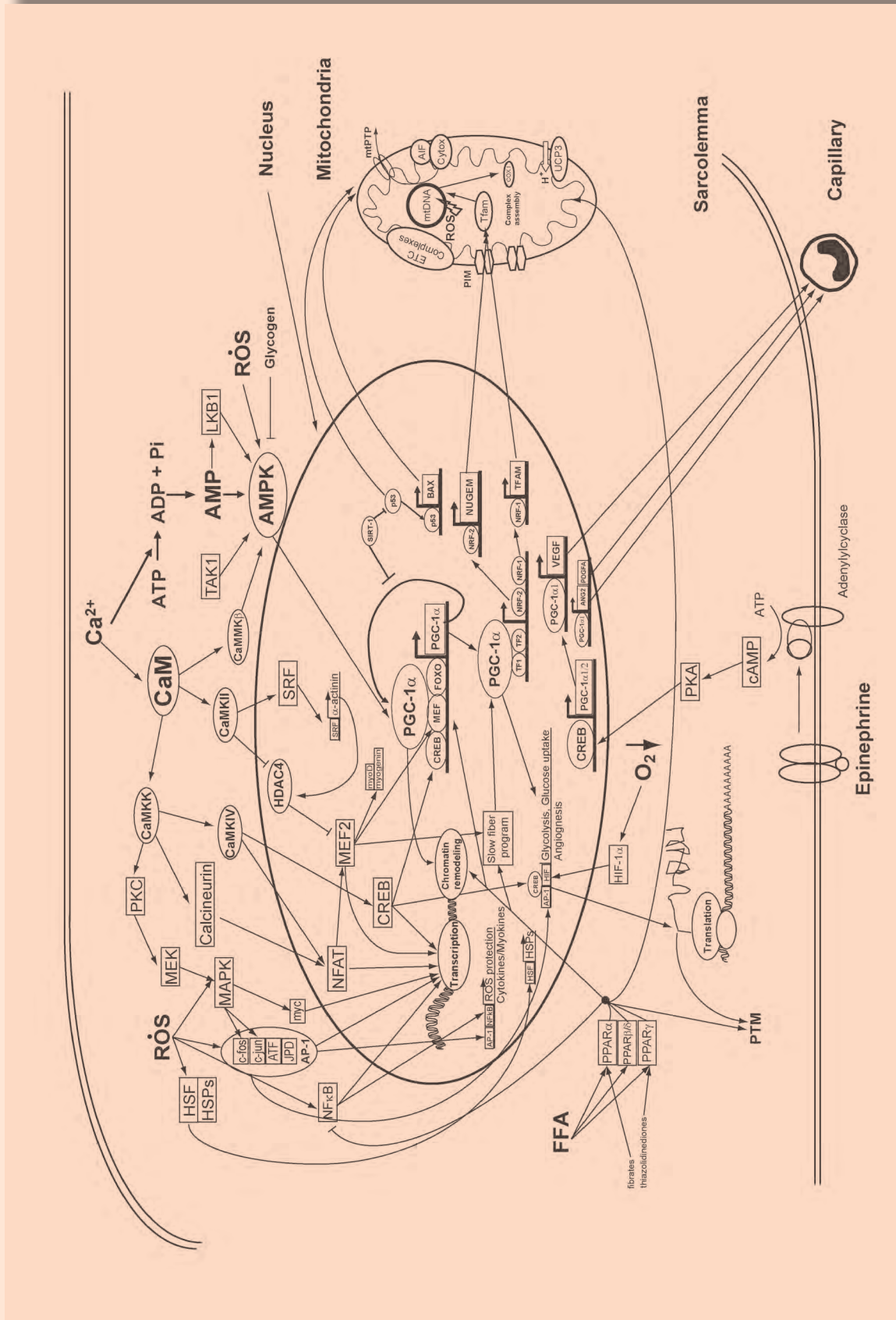


Figure 7. Signaling network in muscle tissue as relevant for endurance adaptations (after Hoppeler, Baum et al., 2011)

Figure 7. Xarxa de senyals en el teixit muscular determinants en les adaptacions d'alta resistència (segons Hoppeler et al., 2011)

Future of muscle research and exercise science

I have personally lived the transition of exercise science from a descriptive study of functional (and structural) phenomena important for human exercise performance to a science that seeks mechanistic explanations for these very phenomena. Where do we go from here?

There are essentially unexplored levels of molecular control over phenotypic malleability that need investigation. One of the mechanisms of potential interest to exercise scientists is epigenetics i.e. the control of gene expression and thus phenotype beyond DNA. Epigenetic mechanism can modify the genome in a functionally relevant way without changes in the nucleotide sequence. This happens through mechanisms such as DNA methylation and de-methylation or histone modification which influence DNA usage through repressor proteins. Some of the epigenetic modifications of the genome are stable over long periods of time (cellular memory) or may even (rarely) be heritable (Ehlert, Simon, & Moser, 2013). The study of epigenetic changes of the genome with exercise might lead to a better understanding of how exercise at young age may change sport attitude and performance later in life. Epigenetic changes may also be responsible for long-term health effects of exercise, for training – re-training phenomena and for muscle dysfunctions related to diseases (Barreiro & Sznajder 2013; Kirchner, Osler, Krook, & Zierath, 2013).

Another area of major development of exercise science is the exploration of the mechanisms that link physical exercise to health and well-being. In this context Pedersen et al. (2003) published a ground-breaking paper providing evidence for muscle to produce anti-inflammatory substances during exercise. These authors coined the term of myokines for peptides released from muscle during activity. There are currently over 10 myokines identified that serve different functions, mainly tissue cross-talk between muscle, adipose tissue, brain etc. some of which having anti-inflammatory actions. With the concept of myokines the diverse health promoting effects of muscle activity can now be approached experimentally and have become amenable to mechanistic scientific scrutiny (Pedersen & Febbraio, 2012). Exercise science needs

El futur de la investigació del múscul i de la ciència de l'exercici

He viscut personalment la transició de la ciència de l'exercici des d'un estudi descriptiu dels fenòmens funcionals (i estructurals) importants per al rendiment físic humà, fins al d'una ciència que cerca explicacions mecanicistes d'aquests mateixos fenòmens. A partir d'aquí, quin és el futur?

En realitat, hi ha àmbits inexplorats del control molecular sobre l'adaptabilitat fenotípica que requereixen una investigació. Un dels mecanismes d'interès potencial dels científics que investiguen l'exercici és l'epigenètica, és a dir, el control de l'expressió gènica i per tant el fenotip més enllà de l'ADN. El mecanisme epigenètic pot modificar el genoma d'una manera rellevant funcionalment, sense produir canvis en la seqüència de nucleòtids. Això ocorre a través de mecanismes com la metilació de l'ADN i la desmetilació o modificació de les histones que influeixen en l'ús d'ADN a través de les proteïnes repressores. Algunes de les modificacions epigenètiques del genoma són estables durant llargs períodes de temps (memòria cel·lular) i poden fins i tot (rarament) ser heretables (Ehlert, Simon, & Moser, 2013). Estudiar els canvis epigenètics del genoma a través de l'exercici físic pot conduir a una millor comprensió de com l'exercici en edat jove pot canviar l'actitud esportiva i el rendiment en una edat més avançada. Els canvis epigenètics també poden ser responsables dels efectes de l'exercici a llarg termini per a la salut, per a l'entrenament-reentrenament i per a les disfuncions musculars relacionades amb malalties (Barreiro & Sznajder 2013; Kirchner, Osler, Krook, & Zierath, 2013).

Una altra àrea en gran desenvolupament de la ciència de l'exercici és l'exploració dels mecanismes que vinculen l'exercici físic a la salut i el benestar. En aquest context, Pedersen et al. (2003) van publicar un article innovador que comprova el fet que els músculs produeixen substàncies antiinflamatòries durant l'exercici físic. Els autors van denominar mioquines els pèptids alliberats pels músculs durant l'activitat física. Actualment hi ha més de deu mioquines identificades que compleixen diferents funcions, principalment teixits que es comuniquen entre si, amb el teixit adipós, amb el cervell, etc., alguns dels quals tenen efectes antiinflamatoris. Amb l'aparició del concepte de mioquines, la diversa promoció dels efectes de l'activitat muscular sobre la salut es pot abordar de manera experimental i aquests són susceptibles d'un escrutini científic mecanicista (Pedersen & Febbraio, 2012). La ciència de l'exercici ha d'adoptar

to embrace these novel concepts as the science that first and foremost explores the conditions related the human being when physically active.

References

- Abernethy, P. J., Jürimäe, J., Logan, P. A., Taylor A. W., & Thayer, R. E. (1994). Acute and chronic response of skeletal muscle to resistance exercise. *Sports Medicine*, 17(1), 22-38. doi:10.2165/00007256-199417010-00003
- Andersen, P. (1975). Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta Physiologica Scandinavica*, 95(2), 203-205. doi:10.1111/j.1748-1716.1975.tb10043.x
- Andersen, P., & Saltin, B. (1985). Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *The Journal of Physiology*, 366(1), 233-249.
- Astrand, P. O. (1956). Human physical fitness with special reference to sex and age. *Physiological Reviews*, 36(3), 307-335.
- Barreiro, E., & Sznajder, J. I. (2013). Epigenetic regulation of muscle phenotype and adaptation: A potential role in COPD muscle dysfunction. *Journal of Applied Physiology*. Jan 10. [Epub ahead of print].
- Bergstrom, J. (1962). Muscle electrolytes in man determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 14 (suppl. 68), 1-110.
- Brooks G. A., & Mercier, J. (1994). Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *Journal of Applied Physiology*, 76(6), 2253-2261.
- Conley, K. E., Kayar, S. R., & Rosler, K. (1987). Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand: IV. Capillaries and their relationship to oxidative capacity. *Respiration Physiology*, 69(1), 47-64. doi:10.1016/0034-5687(87)90100-9
- Ehlert, T., Simon, P., Moser, & D. A. (2012). Epigenetics in sports. *Sports Medicine*, 43(2), 93-110. doi:10.1007/s40279-012-0012-y
- Fitts, R. H., & Widrick, J. J. (1996). Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 24(1), 427-473. doi:10.1249/00003677-199600240-00016
- Flück, M. (2003). Molekulare Mechanismen der muskulären Anpassung. *Therapeutische Umschau*, 60(7), 371-381. doi:10.1024/0040-5930.60.7.371
- Folland, J. P., & Williams, A. G. (2007). The adaptations to strength training: morphological and neurological contributions to increased strength. *Sports Medicine*, 37(2), 145-68. doi:10.2165/00007256-200737020-00004
- Gollnick, P. D., & King, D. W. (1969). Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 216(6), 1502-1509.
- Gollnick, P. D., & Saltin, B. (1982). Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clinical Physiology*, 2(1), 1-12.
- Gould, M. K., & Rawlinson, W. A. (1959). Biochemical adaptation as a response to exercise. Effect of swimming on the levels of lactic dehydrogenase, malic dehydrogenase and phosphorylase in muscles of 8-, 11- and 15-week-old rats. *Biochemical Journal*, 73(1), 41-44.
- Hearn, G. R., & Wainio, W. W. (1956). Succinic dehydrogenase activity of the heart and skeletal muscle of exercised rats. *American Journal of Physiology*, 185(2), 348-350
- Holloszy, J. O. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 242(9), 2278-2282.
- Hoppeler, H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *International Journal of Sports Medicine*, 7(4), 187-204. doi:10.1055/s-2008-1025758
- Hoppeler, H. (1990). The different relationship of $\dot{V}O_{2\max}$ to muscle

quests nous conceptes per explorar primer de tot les condicions relacionades amb el benestar de l'ésser humà actiu físicament.

Referències

- Abernethy, P. J., Jürimäe, J., Logan, P. A., Taylor A. W., & Thayer, R. E. (1994). Acute and chronic response of skeletal muscle to resistance exercise. *Sports Medicine*, 17(1), 22-38. doi:10.2165/00007256-199417010-00003
- Andersen, P. (1975). Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta Physiologica Scandinavica*, 95(2), 203-205. doi:10.1111/j.1748-1716.1975.tb10043.x
- Andersen, P., & Saltin, B. (1985). Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *The Journal of Physiology*, 366(1), 233-249.
- Astrand, P. O. (1956). Human physical fitness with special reference to sex and age. *Physiological Reviews*, 36(3), 307-335.
- Barreiro, E., & Sznajder, J. I. (2013). Epigenetic regulation of muscle phenotype and adaptation: A potential role in COPD muscle dysfunction. *Journal of Applied Physiology*. Jan 10. [Epub previ a la impressió].
- Bergstrom, J. (1962). Muscle electrolytes in man determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 14 (suppl. 68), 1-110.
- Brooks G. A., & Mercier, J. (1994). Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *Journal of Applied Physiology*, 76(6), 2253-2261.
- Conley, K. E., Kayar, S. R., & Rosler, K. (1987). Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand: IV. Capillaries and their relationship to oxidative capacity. *Respiration Physiology*, 69(1), 47-64. doi:10.1016/0034-5687(87)90100-9
- Ehlert, T., Simon, P., Moser, & D. A. (2012). Epigenetics in sports. *Sports Medicine*, 43(2), 93-110. doi:10.1007/s40279-012-0012-y
- Fitts, R. H., & Widrick, J. J. (1996). Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 24(1), 427-473. doi:10.1249/00003677-199600240-00016
- Flück, M. (2003). Molekulare Mechanismen der muskulären Anpassung. *Therapeutische Umschau*, 60(7), 371-381. doi:10.1024/0040-5930.60.7.371
- Folland, J. P., & Williams, A. G. (2007). The adaptations to strength training: morphological and neurological contributions to increased strength. *Sports Medicine*, 37(2), 145-68. doi:10.2165/00007256-200737020-00004
- Gollnick, P. D., & King, D. W. (1969). Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 216(6), 1502-1509.
- Gollnick, P. D., & Saltin, B. (1982). Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clinical Physiology*, 2(1), 1-12.
- Gould, M. K., & Rawlinson, W. A. (1959). Biochemical adaptation as a response to exercise. Effect of swimming on the levels of lactic dehydrogenase, malic dehydrogenase and phosphorylase in muscles of 8-, 11- and 15-week-old rats. *Biochemical Journal*, 73(1), 41-44.
- Hearn, G. R., & Wainio, W. W. (1956). Succinic dehydrogenase activity of the heart and skeletal muscle of exercised rats. *American Journal of Physiology*, 185(2), 348-350
- Holloszy, J. O. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 242(9), 2278-2282.
- Hoppeler, H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *International Journal of Sports Medicine*, 7(4), 187-204. doi:10.1055/s-2008-1025758
- Hoppeler, H. (1990). The different relationship of $\dot{V}O_{2\max}$ to muscle

- mitochondria in humans and quadrupedal animals. *Respiration Physiology*, 80(2-3):137-145. doi:10.1016/0034-5687(90)90077-C
- Hoppeler, H., Baum, O., Lurman, G., & Mueller, M. (2011). Molecular mechanisms of muscle plasticity with exercise. *Comprehensive Physiology*, 1(3), 1383-1412.
- Hoppeler, H., & Fluck, M. (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35(1), 95-104. doi:10.1097/00005768-200301000-00016
- Hoppeler, H., Howald, H., Conley, K., Lindstedt, S. L., Claassen H., Vock, P., & Weibel, E. R. (1985). Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 59(2), 320-327.
- Hoppeler, H., Lindstedt, S. L., Uhlmann E., Niesel, A., Cruz-Orive, L. M., & Weibel, E. R. (1984). Oxygen consumption and the composition of skeletal muscle tissue after training and inactivation in the European woodmouse (*Apodemus sylvaticus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 155(1), 51-61. doi:10.1007/BF00688791
- Hoppeler, H., & Lindstedt, S. L. (1985). Malleability of skeletal muscle in overcoming limitations: structural elements. *The Journal of Experimental Biology*, 115(1), 355-364.
- Hoppeler, H., Lüthi, P., Claassen, H., Weibel, E. R., & Howald, H. (1973). The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women, and well-trained orienteers. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 344(3), 217-232. doi:10.1007/BF00588462
- Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O., & Straub, R. (1985). Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 403(4), 369-376. doi:10.1007/BF00589248
- Huxley H. E. (1957). The double array of filaments in cross-striated muscle. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(5), 631-648. doi:10.1083/jcb.3.5.631
- Kayar, S. R., Hoppeler, H., Armstrong, R. B., Laughlin, M. H., Lindstedt, S. L., Jones, J. H., ... Taylor, C. R. (1992). Estimating transit time for capillary blood in selected muscles of exercising animals. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 421(6), 578-584. doi:10.1007/BF00375054
- Kirchner, H., Osler, M. E., Krook, A., & Zierath, J. R. (2013). Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention? *Trends in Cell Biology*, 23(5), 203-209. doi:10.1016/j.tcb.2012.11.008
- Lindstedt, S. L., & Conley, K. E. (2001). Human aerobic performance: too much ado about limits to VO₂. *The Journal of Experimental Biology*, 204(18), 3195-3199.
- Lindstedt, S. L., Wells, D. J., Jones, J. H., Hoppeler, H., & Thronson, H. A. Jr. (1988). Limitations to aerobic performance in mammals: interaction of structure and demand. *International Journal of Sports Medicine*, 9(3), 210-217. doi:10.1055/s-2007-1025008
- Lüthi, J. M., Howald, H., Claassen, H., Rösler, K., Vock, P., & Hoppeler, H. (1986). Structural changes in skeletal muscle tissue with heavy-resistance exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 7(3), 123-127. doi:10.1055/s-2008-1025748
- Mathieu, O., Cruz-Orive, L. M., Hoppeler, H., & Weibel, E. R. (1983). Estimating length density and quantifying anisotropy in skeletal muscle capillaries. *Journal of Microscopy*, 131(2), 131-146. doi:10.1111/j.1365-2818.1983.tb04240.x
- Morgan, T. E., Cobb, L. A., Short, F. A., Ross, R., & Gunn, D.R. (1971). Effects of long-term exercise on human muscle mitochondria. In B. Pernow & B. Saltin (Eds.), *Muscle metabolism during exercise* (Vol. 11), New York: Plenum. doi:10.1007/978-1-4613-4609-8_8
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews. Endocrinology*, 8(8), 457-465. doi:10.1038/nrendo.2012.49
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., ... Saltin, B. (2003). Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 24(2-3), 113-119. doi:10.1023/A:1026070911202
- mitochondria in humans and quadrupedal animals. *Respiration Physiology*, 80(2-3):137-145. doi:10.1016/0034-5687(90)90077-C
- Hoppeler, H., Baum, O., Lurman, G., & Mueller, M. (2011). Molecular mechanisms of muscle plasticity with exercise. *Comprehensive Physiology*, 1(3), 1383-1412.
- Hoppeler, H., & Fluck, M. (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35(1), 95-104. doi:10.1097/00005768-200301000-00016
- Hoppeler, H., Howald, H., Conley, K., Lindstedt, S. L., Claassen H., Vock, P., & Weibel, E. R. (1985). Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 59(2), 320-327.
- Hoppeler, H., Lindstedt, S. L., Uhlmann E., Niesel, A., Cruz-Orive, L. M., & Weibel, E. R. (1984). Oxygen consumption and the composition of skeletal muscle tissue after training and inactivation in the European woodmouse (*Apodemus sylvaticus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 155(1), 51-61. doi:10.1007/BF00688791
- Hoppeler, H., & Lindstedt, S. L. (1985). Malleability of skeletal muscle in overcoming limitations: structural elements. *The Journal of Experimental Biology*, 115(1), 355-364.
- Hoppeler, H., Lüthi, P., Claassen, H., Weibel, E. R., & Howald, H. (1973). The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women, and well-trained orienteers. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 344(3), 217-232. doi:10.1007/BF00588462
- Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O., & Straub, R. (1985). Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 403(4), 369-376. doi:10.1007/BF00589248
- Huxley H. E. (1957). The double array of filaments in cross-striated muscle. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(5), 631-648. doi:10.1083/jcb.3.5.631
- Kayar, S. R., Hoppeler, H., Armstrong, R. B., Laughlin, M. H., Lindstedt, S. L., Jones, J. H., ... Taylor, C. R. (1992). Estimating transit time for capillary blood in selected muscles of exercising animals. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 421(6), 578-584. doi:10.1007/BF00375054
- Kirchner, H., Osler, M. E., Krook, A., & Zierath, J. R. (2013). Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention? *Trends in Cell Biology*, 23(5), 203-209. doi:10.1016/j.tcb.2012.11.008
- Lindstedt, S. L., & Conley, K. E. (2001). Human aerobic performance: too much ado about limits to VO₂. *The Journal of Experimental Biology*, 204(18), 3195-3199.
- Lindstedt, S. L., Wells, D. J., Jones, J. H., Hoppeler, H., & Thronson, H. A. Jr. (1988). Limitations to aerobic performance in mammals: interaction of structure and demand. *International Journal of Sports Medicine*, 9(3), 210-217. doi:10.1055/s-2007-1025008
- Lüthi, J. M., Howald, H., Claassen, H., Rösler, K., Vock, P., & Hoppeler, H. (1986). Structural changes in skeletal muscle tissue with heavy-resistance exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 7(3), 123-127. doi:10.1055/s-2008-1025748
- Mathieu, O., Cruz-Orive, L. M., Hoppeler, H., & Weibel, E. R. (1983). Estimating length density and quantifying anisotropy in skeletal muscle capillaries. *Journal of Microscopy*, 131(2), 131-146. doi:10.1111/j.1365-2818.1983.tb04240.x
- Morgan, T. E., Cobb, L. A., Short, F. A., Ross, R., & Gunn, D.R. (1971). Effects of long-term exercise on human muscle mitochondria. A B. Pernow & B. Saltin (Eds.), *Muscle metabolism during exercise* (Vol. 11), New York: Plenum. doi:10.1007/978-1-4613-4609-8_8
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews. Endocrinology*, 8(8), 457-465. doi:10.1038/nrendo.2012.49
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., ... Saltin, B. (2003). Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 24(2-3), 113-119. doi:10.1023/A:1026070911202

- Richardson, R. S., & Saltin, B. (1998). Human muscle blood flow and metabolism studied in the isolated quadriceps muscles. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 30(1), 28-33. doi:10.1097/00005768-199801000-00005
- Roberts, T. J., Weber, J. M., Hoppeler, H., Weibel, E. R., & Taylor C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. II. Defining the upper limits of carbohydrate and fat oxidation. *The Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1651-1658
- Romijn, J. A., Coyle, E. F., Sidossis, L. S., Gastaldelli, A., Horowitz, J. F., Endert, E., & Wolfe, R. R. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *American Journal of Physiology*, 265 (3 Pt 1), E380-391.
- Saltin, B., & Gollnick, P. D. (1983). Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In L. D. Peachy, R. H. Adrian & S. R. Geiger (Eds.), *Handbook of Physiology - Skeletal Muscle* (pp. 555-631). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Spriet, L. L., Gledhill, N., Froese, A. B., & Wilkes, D. L. (1986). Effect of graded erythrocythemia on cardiovascular and metabolic responses to exercise. *Journal of Applied Physiology*, 61(5), 1942-1948.
- Taylor, C. R., Karas, R. H., Weibel, E. R., & Hoppeler, H. (1987). Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand. *Respiration Physiology*, 69(1), 1-127. doi:10.1016/0034-5687(87)90097-1
- Taylor, C. R., Weibel, E. R., Weber, J. M., Vock, R., Hoppeler, H., Roberts, T. J., & Brichon, G. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. I. Model and strategy to test symmorphosis in a network structure. *The Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1643-1649
- Turner, D. L., Hoppeler, H., Noti, C., Gurtner, H. P., Gerber, H., Schena, F., ... Ferretti, G. (1993). Limitations to $\dot{V}O_{2\max}$ in humans after blood retransfusion. *Respiration Physiology*, 92(3), 329-341. doi:10.1016/0034-5687(93)90017-5
- Vock, R., Hoppeler, H., Claassen, H., Wu, D. X., Billeter, R., Weber, J. M., ... Weibel, E. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. VI. Structural basis of intracellular substrate supply to mitochondria in muscle cells. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1689-1697.
- Vock, R., Weibel, E. R., Hoppeler, H., Ordway, G., Weber, J. M., & Taylor, C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. V. Structural basis of vascular substrate supply to muscle cells. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1675-1688.
- Vogt, M., Puntchart, A., Howald, H., Mueller, B., Mannhart, C., Gfeller-Tuescher, L., ... Hoppeler, H. (2003). Effects of dietary fat on muscle substrates, metabolism, and performance in athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35(6), 952-960. doi:10.1249/01.MSS.0000069336.30649.BD
- Weber, J. M., Brichon, G., Zwingelstein, G., McClelland, G., Saucedo, C., Weibel, E. R., & Taylor, C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. IV. Partitioning energy provision from fatty acids. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1667-1674.
- Weber, J. M., Roberts, T. J., Vock, R., Weibel, E. R., & Taylor, C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. III. Partitioning energy provision from carbohydrates. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1659-1666.
- Weibel, E. R., Taylor, C. R., Hoppeler, H. (1991). The concept of symmorphosis: A testable hypothesis of structure-function relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10357-10361. doi:10.1073/pnas.88.22.10357
- Yakovlev, N. N., Krasnova, A. F., Chagovets, N. R. (1963). The influence of muscle activity on muscle proteins. In E. Gutmann & P. Hnik (Eds.), *The effect of use and disuse on neuromuscular functions* (pp. 461-470). Prague: Czech Acad Sci.
- Zumstein, A., Mathieu, O., Howald, H., & Hoppeler, H. (1983). Morphometric analysis of the capillary supply in skeletal muscles of trained and untrained subjects--its limitations in muscle biopsies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 397(4), 277-283. doi:10.1007/BF00580261
- Richardson, R. S., & Saltin, B. (1998). Human muscle blood flow and metabolism studied in the isolated quadriceps muscles. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 30(1), 28-33. doi:10.1097/00005768-199801000-00005
- Roberts, T. J., Weber, J. M., Hoppeler, H., Weibel, E. R., & Taylor C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. II. Defining the upper limits of carbohydrate and fat oxidation. *The Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1651-1658
- Romijn, J. A., Coyle, E. F., Sidossis, L. S., Gastaldelli, A., Horowitz, J. F., Endert, E., & Wolfe, R. R. (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *American Journal of Physiology*, 265 (3 Pt 1), E380-391.
- Saltin, B., & Gollnick, P. D. (1983). Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. A L. D. Peachy, R. H. Adrian & S. R. Geiger (Eds.), *Handbook of Physiology - Skeletal Muscle* (pp. 555-631). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Spriet, L. L., Gledhill, N., Froese, A. B., & Wilkes, D. L. (1986). Effect of graded erythrocythemia on cardiovascular and metabolic responses to exercise. *Journal of Applied Physiology*, 61(5), 1942-1948.
- Taylor, C. R., Karas, R. H., Weibel, E. R., & Hoppeler, H. (1987). Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand. *Respiration Physiology*, 69(1), 1-127. doi:10.1016/0034-5687(87)90097-1
- Taylor, C. R., Weibel, E. R., Weber, J. M., Vock, R., Hoppeler, H., Roberts, T. J., & Brichon, G. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. I. Model and strategy to test symmorphosis in a network structure. *The Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1643-1649
- Turner, D. L., Hoppeler, H., Noti, C., Gurtner, H. P., Gerber, H., Schena, F., ... Ferretti, G. (1993). Limitations to $\dot{V}O_{2\max}$ in humans after blood retransfusion. *Respiration Physiology*, 92(3), 329-341. doi:10.1016/0034-5687(93)90017-5
- Vock, R., Hoppeler, H., Claassen, H., Wu, D. X., Billeter, R., Weber, J. M., ... Weibel, E. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. VI. Structural basis of intracellular substrate supply to mitochondria in muscle cells. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1689-1697.
- Vock, R., Weibel, E. R., Hoppeler, H., Ordway, G., Weber, J. M., & Taylor, C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. V. Structural basis of vascular substrate supply to muscle cells. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1675-1688.
- Vogt, M., Puntchart, A., Howald, H., Mueller, B., Mannhart, C., Gfeller-Tuescher, L., ... Hoppeler, H. (2003). Effects of dietary fat on muscle substrates, metabolism, and performance in athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35(6), 952-960. doi:10.1249/01.MSS.0000069336.30649.BD
- Weber, J. M., Brichon, G., Zwingelstein, G., McClelland, G., Saucedo, C., Weibel, E. R., & Taylor, C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. IV. Partitioning energy provision from fatty acids. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1667-1674.
- Weber, J. M., Roberts, T. J., Vock, R., Weibel, E. R., & Taylor, C. R. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. III. Partitioning energy provision from carbohydrates. *Journal of Experimental Biology*, 199(8), 1659-1666.
- Weibel, E. R., Taylor, C. R., Hoppeler, H. (1991). The concept of symmorphosis: A testable hypothesis of structure-function relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10357-10361. doi:10.1073/pnas.88.22.10357
- Yakovlev, N. N., Krasnova, A. F., Chagovets, N. R. (1963). The influence of muscle activity on muscle proteins. In E. Gutmann & P. Hnik (Eds.), *The effect of use and disuse on neuromuscular functions* (pp. 461-470). Prague: Czech Acad Sci.
- Zumstein, A., Mathieu, O., Howald, H., & Hoppeler, H. (1983). Morphometric analysis of the capillary supply in skeletal muscles of trained and untrained subjects--its limitations in muscle biopsies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 397(4), 277-283. doi:10.1007/BF00580261