

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,

Cuarenta años de investigación sobre la plasticidad del músculo esquelético; conclusiones personales

HANS HOPPELER

Instituto de Anatomía
Universidad de Berna (Suiza)

Resumen

Este es un estudio personal altamente subjetivo sobre la investigación llevada a cabo durante los últimos 50 años que documenta los fenómenos y los mecanismos de la plasticidad del tejido muscular esquelético. Enfocaré el trabajo desde una perspectiva histórica y seguiré algunos de los hilos que han despertado mi curiosidad y han guiado mi investigación a lo largo de mi carrera investigadora. Este estudio no es ni exhaustivo ni equilibrado. Representa mis intereses personales y algunos descubrimientos cruciales que han marcado mis objetivos de investigación. He tenido la suerte de llevar a cabo este estudio con colaboradores muy creativos que han sido los que han realizado la mayor parte de esta investigación. También he tenido la suerte de contar con dos tutores excepcionales, ER Weibel y C.R. Taylor, que me han apoyado durante todo el proceso guiándome y dándome consejos e, inicialmente, facilitándome la ayuda económica necesaria. Han fomentado un enfoque global y me han enseñado a combinar la investigación funcional y estructural para lograr una visión integral del rendimiento del sistema. Cuando las herramientas moleculares apropiadas pasaron a estar disponibles a finales de los 90, estas ayudaron a descubrir los mecanismos subyacentes de la plasticidad estructural y funcional del músculo previamente descrita. La idea de que el tejido muscular esquelético activo es determinante para el bienestar físico y para la salud continuará impulsando la investigación mecanicista de la plasticidad muscular en el futuro.

Palabras clave: músculo, plasticidad, mitocondria, capilar, $VO_2 máx$

El músculo como tejido maleable

El tejido muscular esquelético comprende alrededor del 40% de la masa corporal. Es, por tanto, el más abundante de todos los tejidos humanos. Es sorprendente como el mecanismo de la tarea más esencial del músculo, la capacidad de contraerse y realizar un trabajo mecánico, ha permanecido vaga

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

e imprecisa durante tanto tiempo. A partir de la microscopía electrónica, Huxley (1957) estableció el mecanismo del “filamento deslizante”, el cual permite explicar satisfactoriamente los fenómenos mecánicos de la contracción muscular. Lo que permaneció sin resolver en ese momento fue si la capacidad de producir fuerza podía ser extrínsecamente modificada, por ejemplo, si el tejido muscular esquelético era fenotípicamente modificable, o no. Así como la modificación de la capacidad del rendimiento físico humano fue científicamente establecida en los años 50, tal y como describió Astrand (1956), la plasticidad estructural del tejido muscular no lo fue. Astrand (1956) señaló que el rendimiento humano excepcional, ejemplificado por hitos de atletas de élite, era el resultado tanto del talento natural como del entrenamiento específico, por lo que se supuso que factores centrales como el gasto cardíaco eran suficientes para explicar los cambios en la capacidad de rendimiento inducidos por el ejercicio.

Mientras que la adaptabilidad del rendimiento físico humano era bastante obvia y estaba bien documentada, permaneció confuso como, a nivel del tejido muscular esquelético, el rendimiento era modificado por el entrenamiento físico. Se inició un debate sobre la cuestión de si el músculo era un tejido esencialmente inalterable o si, por el contrario, el entrenamiento físico podía llevar a modificaciones (estructurales) notables argumentando que el ejercicio físico inducía cambios en el rendimiento de la musculatura. Mientras que científicos rusos constataron numerosas actividades enzimáticas tales como la hexoquinasa y la succinato deshidrogenasa después del ejercicio tanto en el corazón como en el tejido muscular esquelético (Yakovlev, Krasnova, & Chagovets, 1963), otras investigaciones de ese momento indicaban que incluso el ejercicio prolongado no conducía a modificaciones enzimáticas en el tejido muscular (Gould & Rawlinson, 1959; Hearn & Wainio, 1956).

Holloszy (1967) publicó el primer estudio que mostró de forma inequívoca cambios considerables en la capacidad de resistencia así como también en el contenido mitocondrial en el tejido muscular esquelético de ratas en crecimiento después de un entrenamiento intenso. Se hizo correr ratas macho de seis semanas en un *treadmille* siguiendo un programa de entrenamiento físico incremental. El programa duró 12 semanas, durante las cuales las ratas corrían 10 minutos a 22 m por minuto dos veces al día. Al final del período de entrenamiento, las ratas corrían 120 minutos a 31 m por minuto con 12 esprints de 20 segundos a 42 m por minuto. Holloszy (1967) descubrió que la capacidad de oxidar el piruvato a partir de mitocondrias aisladas del músculo gastrocnemius de ratas entrenadas se

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).

duplicaba junto con las actividades de las enzimas oxidativas tales como la Citocromo C reductasa, la Succinato oxidasa y la Citocromo oxidasa. Así como la concentración de Citocromo C también aumentó en un factor de casi 2, Holloszy (1967) concluyó que este aumento de actividad de las enzimas respiratorias se debía a un incremento de las proteínas mitocondriales. El innovador estudio de Holloszy (1967) estableció finalmente la excepcional adaptabilidad del tejido muscular esquelético y definía las mitocondrias como las entidades estructurales esenciales sujetas a la modificación en masa con el entrenamiento físico de resistencia. El estudio también indicaba que es necesario utilizar protocolos de ejercicio intensos e incrementales para inducir modificaciones estructurales demostrables a partir del entrenamiento. Pocos años más tarde, Gollnick y King (1969) publicaron un estudio en el que las ratas eran entrenadas y forzadas a correr y las mitocondrias eran analizadas mediante microscopía electrónica. Los autores concluyeron que las mitocondrias en los músculos esqueléticos de ratas entrenadas eran significativamente más numerosas, más grandes y presentaban las crestas mitocondriales más densas que las mitocondrias de ratas control. También señalaron que las mitocondrias y las fibras musculares de las ratas que corrían hasta estar exhaustas aparecían inflamadas. Este estudio confirmó los resultados de Holloszy (1967), demostrando, mediante microscopía electrónica, variaciones del volumen del compartimiento mitocondrial como consecuencia del entrenamiento físico de resistencia. A pesar de ello, hubo una serie de lagunas técnicas que hicieron que estos resultados, fueran más cualitativos que no cuantitativos. La técnica morfométrica utilizada para medir el tamaño mitocondrial y la densidad numérica era inadecuada, así como también la fijación del tejido muscular. Gollnick y King usaron un 1% de tetróxido de osmio en el tampón de acetato barbital a 350-400 mOsm. Posteriormente, descubrimos que estas condiciones eran insuficientes para el tejido muscular y utilizamos una prefijación de osmolaridad más alta en glutaraldehído (Hoppeler, Lüthi, Claassen, Weibel, & Howald, 1973).

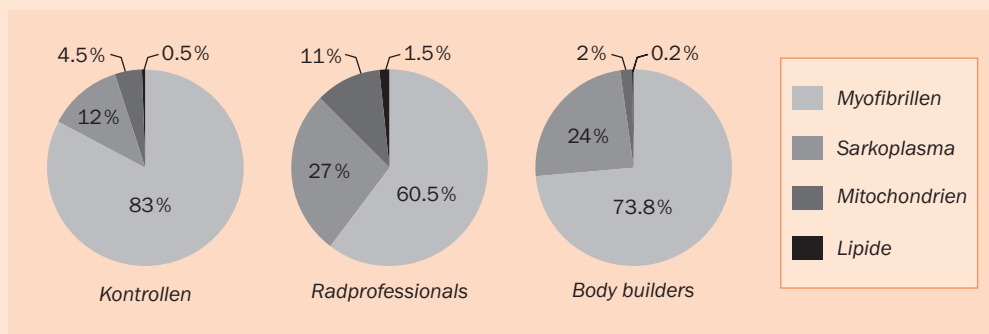


Figure 1. Distribution of key muscle components in controls, professional cyclists and body builders (redrawn from Hoppeler, 1986)

Figura 1. Distribución de componentes musculares claves en los controles, de ciclistas profesionales y culturistas (adaptado 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 VO_2 max

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 VO_2 max 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. VO_2 max 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 VO_2 max 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

Un poco más tarde, Cobb, Short, Ross, & Gunn (1971) sometieron a personas voluntarias a ejercicios progresivos con una pierna en una bicicleta estática dos horas al día durante un mes. Se realizaron biopsias musculares, se analizaron bioquímicamente, y se procesaron para una microscopía electrónica. Encontraron un incremento en la actividad de enzimas respiratorias así como también en el contenido proteico mitocondrial. Estos cambios fueron reforzados estructuralmente por un incremento del 55% en la fracción del volumen de las mitocondrias, este último fue demostrado por técnicas estereológicas clásicas.

Mitocondrias y VO_2 máx

Este era el antecedente del estudio en 1971 cuando, como estudiante de medicina, enseñaba fisiología del ejercicio en la Federal School of Physical Education (ESSM) en Magglingen, Suiza. El director de este Instituto de Investigación era Hans Howald, que recientemente había aprendido, con Bengt Saltin en Escandinavia, a obtener biopsias musculares mediante la técnica Bergstrom (1962) con aguja.

Entre el Instituto de Investigación y el Departamento de Anatomía de la Universidad de Berna (Suiza) se creó una colaboración de investigación dirigida por Ewald R. Weibel, (financiada por la Swiss National Science Foundation) para llevar a cabo estudios estereológicos mediante microscopía electrónica del tejido muscular esquelético a partir de biopsias de sujetos entrenados y no entrenados caracterizados funcionalmente por un test VO_2 máx. El estudio comprendía 18 sujetos, 6 de los cuales pertenecían al equipo suizo de orientadores que habían ganado la medalla de plata en el campeonato del mundo de orientación en 1970. El VO_2 máx. variaba de 39 a 84 mlO₂/min x kg y como descubrimiento principal pudimos constatar una alta correlación entre la densidad del volumen de las mitocondrias de los músculos en biopsias de vastus lateralis y el VO_2 máx. de los sujetos estudiados. También pudimos constatar que las mitocondrias de los sujetos entrenados eran estructuralmente indistinguibles de las mitocondrias de los sujetos no entrenados en cuanto a la densidad de la superficie de las crestas y las fracciones de volumen de los espacios internos (volumen de la matriz y espacio intermembranosos). Los descubrimientos adicionales que han resistido el paso del tiempo fueron que los sujetos entrenados tenían un fracción significativamente mayor del total de mitocondrias situadas en una posición subsarcolemal y que la fracción de volumen de los lípidos intramiocelulares era más del doble comparada con la de los sujetos no entrenados. De

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

forma global, este estudio llevó a la conclusión que el volumen máximo de oxígeno no estaba limitado por la capacidad del sistema cardiovascular sino también por la capacidad oxidativa de las mitocondrias de los músculos esqueléticos. Esta afirmación provocó una controversia que duró un año sobre la limitación central vs. periférica (véase a continuación).

El estudio de 1973 del VO_2 máx. y del volumen mitocondrial fue (y aún es) altamente citado con la limitación de ser correlativo. Una vez terminados mis estudios de medicina, y después de tres años como interno en un hospital, volví al Departamento de Anatomía para comenzar mi carrera académica. Una de mis ambiciones era verificar los resultados correlativos de nuestro estudio de 1973 en un estudio de intervención y explorar en profundidad la relación entre las mitocondrias y el consumo de oxígeno a nivel animal. Llevamos a cabo un estudio de entrenamiento de 6 semanas en el que 8 sujetos previamente no entrenados tuvieron que seguir un entrenamiento 5 veces por semana con una carga entre el 85-90% de la frecuencia cardíaca máxima durante la mayor parte del entrenamiento. Este entrenamiento causó un incremento de un 40% del volumen mitocondrial en los músculos vastus lateralis, un incremento del 33% de la carga máxima que podríamos soportar durante una sesión de entrenamiento y un incremento del 14% del VO_2 máx. Pudimos, además confirmar la proliferación preferencial de mitocondrias subsarcolemáticas así como la duplicación de lípidos intramiocelulares (Hoppeler, Howald et al., 1985). Se comprobó que las mitocondrias incrementaban significativamente en los tres tipos de fibras, lo que sugiere una activación de todos los tipos



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. Fotografía original de la aguja de Bergstrom (Bergstrom 1962) utilizada en el estudio de 1973, con medidas de asepsia y de protección rudimentarios (Hoppeler et al 1973.). Típico de esa época

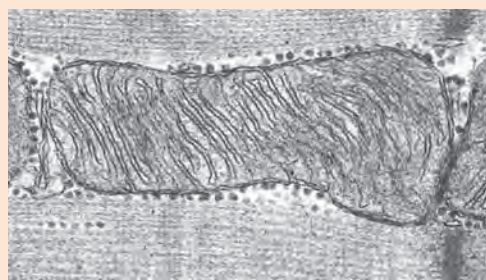


Figure 3. Micrograph of a mitochondrion in a longitudinal section of muscle tissue

Figura 3. Micrografía de una mitocondria en una sección longitudinal del tejido 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 $VO_2\text{max}$

de fibras musculares en un ejercicio exhaustivo de resistencia llevado a cabo al 20% del rendimiento máximo de *sprint* posible por el músculo involucrado (Howald, Hoppeler, Claassen, Mathieu, & Straub, 1985). Estos estudios confirmaron la gran plasticidad, a corto plazo, del tejido muscular esquelético y señalaron el hecho de que cambios locales de la capacidad oxidativa del músculo podrían estar correlacionados con cambios funcionales locales (potencia de salida aeróbica) pero no inmediatamente correlacionados con cambios globales en el $VO_2\text{máx.}$, los cuales resultaron ser más moderados.

Durante ese tiempo realicé un gran estudio comparativo con el objetivo de caracterizar el diseño del sistema respiratorio haciendo un seguimiento de la función y la estructura del recorrido del oxígeno desde los pulmones a las mitocondrias de los músculos esqueléticos (Taylor, Karas, Weibel, & Hoppeler, 1987). En este contexto, todas las variables estructurales relevantes para la transferencia de oxígeno desde el aire a las mitocondrias de los músculos esqueléticos fueron examinadas cuantitativamente utilizando técnicas estereológicas adecuadas para los pulmones, el corazón y el tejido muscular esquelético. El principio básico del estudio era que los animales construirían y mantendrían suficientes (pero no más) estructuras en cada fase de la cascada respiratoria para soportar el máximo flujo de oxígeno a través de todos los compartimentos (sinmorfosis). Hicimos una estimación, por tanto, del $VO_2\text{máx.}$ de un gran número de especies mamíferas en las que el $VO_2\text{máx.}$ era definido como el límite máximo de consumo de oxígeno reproducible individualmente más allá del cual se suministraba anaeróbicamente energía adicional para la locomoción tal y como evidencia la acumulación de lactato en la circulación. Nuestro análisis sacó provecho del hecho de que generalmente se acepta que en situaciones de $VO_2\text{máx.}$, más del 95% del oxígeno circulante por el sistema respiratorio sería consumido por las mitocondrias en músculos esqueléticos activos y que, por tanto, el flujo de oxígeno a través de todos los compartimentos del sistema respiratorio, desde los pulmones a las mitocondrias de los músculos esqueléticos, sería el mismo. Esto nos facilitó un modelo fisiológico cuantitativo tratable del sistema respiratorio de los mamíferos.

En la parte experimental del estudio, estimamos el $VO_2\text{máx.}$ de especies tan pequeñas como el ratón de campo europeo (masa corporal 16 g) y tan grandes como los caballos y los toros (masa corporal 500 kg). Como el $VO_2\text{máx.}$ aumenta con la potencia 0.8 de masa corporal (masa corporal dependiente o variación alométrica del $VO_2\text{máx.}$), esto nos proporcionó una diferencia de peso específico del $VO_2\text{máx.}$ de

of approximately 6-fold between the smallest and the largest species. We further explored adaptive variation of VO_2 max. This is the difference in VO_2 max of two species of similar body mass that exploit different lifestyles, i.e. sedentary vs. active. Adaptive variation of VO_2 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 max. Thirdly, induced variation of VO_2 max is the difference in VO_2 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 max amounts to some 30% in a previously untrained individual.

Allometric and adaptive variation afforded us with sizeable differences in VO_2 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 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 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 max was invariant for all mammalian species with an oxygen consumption of some $5mlO_2/ml$ of mitochondria and minute (Hoppeler & Lindstedt, 1985). Athletic animals were found to reach their higher VO_2 max by two mechanisms. In athletic animals, skeletal muscle tissue is a larger fraction of body mass. In

aproximadamente 6 unidades entre la especie más pequeña y la más grande. Exploramos en más profundidad la variación adaptable del VO_2 máx. Esta es la diferencia entre el VO_2 máx. de dos especies de masa corporal similar con diferentes estilos de vida, por ejemplo, sedentaria vs. activa. La variación adaptable del VO_2 máx. se puede observar entre caballos y vacas o entre perros y cabras y puede llegar a diferencias de 2-3 unidades en el VO_2 máx. específico del peso. En tercer lugar, la variación inducida del VO_2 máx. es la diferencia en el VO_2 máx. que puede ser provocada por el entrenamiento físico en un individuo de una especie. Esta diferencia es comparativamente pequeña, y normalmente se constata que la modificación individual del VO_2 máx. es de más del 30% en un individuo previamente no entrenado.

La variación alométrica y adaptativa nos proporcionó las considerables diferencias en el VO_2 máx. a las cuales pudimos igualar las diferencias de las variables estructurales en cada nivel de la cascada del sistema respiratorio (Weibel, Taylor, & Hoppeler, 1991). A nivel del tejido muscular esquelético estábamos particularmente interesados en las mitocondrias, orgánulos responsables de la demanda de oxígeno, y en los capilares, orgánulos responsables del suministro de oxígeno. Extensos y detallados estudios morfométricos indicaron que, como se había comprobado previamente, en humanos entrenados o no entrenados no hubo diferencias estructurales en las mitocondrias de los músculos mamíferos de los sujetos activos e inactivos, ni entre las especies de animales de tamaño más grande o más pequeño. Del mismo modo, los capilares tenían el mismo tamaño en todas las especies analizadas. En cuanto a las mitocondrias, estos resultados indicaban que el volumen mitocondrial era un descriptor estructural adecuado de la capacidad oxidativa del tejido muscular. Con el fin de establecer una relación entre el VO_2 máx. corporal con el volumen mitocondrial muscular, se tuvo que cuantificar el volumen total de las mitocondrias en toda la musculatura. Esto se hizo desarrollando técnicas de pruebas estadísticas adecuadas (Hoppeler, Lindstedt et al. 1984). El análisis de nuestros datos nos dio un resultado inequívoco. Encontramos una proporcionalidad directa entre el volumen mitocondrial y el VO_2 máx., con más de cinco veces de magnitud, con una pendiente de 1,01 y un R^2 de 0,994 (Hoppeler, 1990). Esto significaba que no sólo la estructura mitocondrial, sino también la función mitocondrial en el VO_2 máx. era invariante para todas las especies de mamíferos, con un consumo de oxígeno de $5mlO_2/ml$ por mitocondria y por minuto (Hoppeler & Lindstedt, 1985). Los animales atléticos llegaban a su máximo VO_2 máx. por dos mecanismos. El tejido muscular esquelético en los animales atléticos, representa una fracción mayor de la masa corporal. En



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

Figura 4.
Medición del VO_2 máx. de un
ciclista profesional

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

los animales sedentarios, el tejido muscular esquelético suele ser menos de un 30% de la masa corporal, mientras que en los animales atléticos puede llegar hasta 50%. Además, la fracción del volumen de las mitocondrias por volumen de tejido muscular es siempre mayor en las especies atléticas.

¿Y cómo funciona en los humanos? A juzgar por la proporción de VO_2 máx. en la masa corporal, los humanos deberían pertenecer al grupo de las especies sedentarias. Con $40\text{-}50\text{mlO}_2/\text{min} \times \text{kg}$ tenían que estar en el grupo de animales sedentarios como las cabras y las vacas y no con los perros y los caballos atléticos ($> 130\text{mlO}_2/\text{min} \times \text{kg}$). La representación gráfica de los datos del volumen mitocondrial con el VO_2 máx. mostró que en los humanos había una sobreabundancia de mitocondrias, más de 2 veces (Hoppeler, 1990). Suponiendo lógicamente, que el consumo de oxígeno mitocondrial de los humanos es similar a todas las otras especies de mamíferos, esta aparente discrepancia se puede explicar por el hecho de que los humanos (que son bípedos) pueden llegar a su VO_2 máx. con un subconjunto de sus músculos (es decir, músculos de las piernas), que por los animales cuadrúpedos es imposible de lograr.

Límites del VO_2 máx

En la fisiología del ejercicio, saber cuál es el límite del VO_2 máx. ha sido un tema muy debatido en los últimos 50 años.

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

La opinión dominante era que la liberación de oxígeno por el corazón a la periferia tenía que ser el único o al menos el marco principal del VO_2 máx. en un individuo. Había muchas evidencias que demostraban una limitación central del VO_2 máx. En un ensayo, Gollnick y Saltin (1982) señaló que "... los cambios relativos de las enzimas (oxidativas) en el músculo esquelético del hombre después de un entrenamiento de resistencia son muy superiores a la subida del VO_2 máx., que sugiere que no existe una relación de causa directa a efecto entre estas variables." El concepto de que las adaptaciones periféricas (mitocondriales) tenían que coincidir con la adaptación central (cardíaca) fue refutado en el estudio del entrenamiento publicado en 1985 (Hoppeler et. al 1985). De hecho, en este estudio descubrimos un cambio de la densidad del volumen mitocondrial (+40%), que era mucho mayor que el aumento del VO_2 máx. (+14%), pero similar al aumento de la potencia máxima que los sujetos pudieron mantener durante más de 30 minutos (+33%). De esta manera pudimos calcular la cantidad de oxígeno necesaria para producir la potencia adicional que los sujetos tenían después de haber entrenado ($1W = 2.99\text{mlO}_2/\text{min}$), teniendo en cuenta la eficiencia del ciclismo (0.21). Se descubrió que el cambio absoluto en el VO_2 máx. observada en la prueba del rendimiento, era el responsable del cambio absoluto en la potencia mantenida. Esto indicó que una masa muscular relativamente pequeña produce la salida de la potencia adicional observada y por lo tanto muestra un cambio relativamente grande en la capacidad oxidativa en comparación con la relativamente pequeña adaptación central.

Una pista importante para una limitación central del VO_2 máx. es la posibilidad de manipular el VO_2 máx. mediante la manipulación del contenido de oxígeno arterial a través del aumento o la disminución de las células rojas. De hecho, y como es lógico, en los casos de anemia, la disminución de VO_2 máx. es en proporción directa a la entrega de oxígeno (Lindstedt et. Al 1988). Por el contrario, el aumento de hematocritos por encima de los valores normales, también aumenta el VO_2 máx., que es una práctica valorada por los ciclistas profesionales. El hecho de que aumentar la entrega de oxígeno aumenta el VO_2 máx. es un fuerte argumento a favor de una limitación central. Sin embargo, mirando más de cerca, Spriet, Gledhill, Froose y Wilkes (1986) encontró que la transfusión de hasta 3 unidades de sangre en corredores altamente entrenados aumentó la liberación de O_2 en un 30%, pero el VO_2 máx. aumentó sólo en un 7% y la extracción de oxígeno en la periferia disminuyó un 90-75% (Lindstedt & Conley, 2001). Turner et al. (1993) obtuvo resultados similares, utilizando también retransfusiones de sangre autóloga en sujetos entrenados, encontró que la relación entre el suministro de oxígeno y el VO_2 máx. tenía una subida significativamente

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 $\dot{V}O_2$ is found to be some 350 ml $\dot{V}O_2$ /min x kg for the small muscle mass and 160 ml $\dot{V}O_2$ /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-

menor a la unidad. Los resultados de ambos estudios indican que al menos, en ejercicios en los que interviene una gran masa muscular, el suministro de oxígeno puede superar la capacidad oxidativa de la mitocondria.

La situación es distinta cuando el volumen de masa muscular es pequeño, como es el caso del extensor de la rodilla, modelo propuesto por Andersen y Saltin (1985). Cuando todo el gasto cardíaco está disponible para el músculo del cuádriceps (2-3 kg), el flujo de sangre puede llegar a ser tan alto como 2,5 l/min x kg. Bajo condiciones de un pedaleo normal (15 kg de músculo activo) el flujo de sangre se estima en sólo 1 l/min x kg. Del mismo modo el pico de $\dot{V}O_2$ es de 350ml $\dot{V}O_2$ /min x kg para una pequeña masa muscular y de 160 ml $\dot{V}O_2$ /min x kg en un pedaleo normal (Richardson y Saltin, 1998). Curiosamente, estos autores señalan que con poca masa muscular el pO_2 menor a 10 mmHg aumenta a más de 20 mmHg con grandes masas musculares en la vena femoral, lo que indica una vez más la incapacidad de la periferia de utilizar el oxígeno liberado.

En general, los resultados disponibles apuntan que en determinadas circunstancias, cada etapa de la cascada del transfer del oxígeno puede cambiar el $\dot{V}O_2$ máx. individual. Sin embargo, en términos generales y mirando a los mamíferos en general, aparece un modelo de equilibrio de tal manera que las estructuras para el suministro de oxígeno están muy adaptados a la demanda de oxígeno y son determinados por el coste energético de la locomoción. Además, encontramos que algunas estructuras pueden variar en proporción a la demanda de oxígeno, las mitocondrias, los capilares, la concentración de hemoglobina, y el tamaño cardíaco (es decir, el volumen sistólico) durante el ciclo de vida de un animal. Otras estructuras, aparentemente, carecen de plasticidad estructural (los pulmones y la tráquea) y tienen que construirse con suficiente capacidad para acomodar el aumento de la demanda de oxígeno provocado por el uso (Lindstedt & Conley, 2001).

Capilares y mitocondrias

Las mitocondrias y los capilares pertenecen a las estructuras más modificables de tejido muscular esquelético. En un estudio longitudinal (1975), Andersen fue el primero, en demostrar que tanto la densidad capilar como el ratio de fibras capilares aumentan como una adaptación al entrenamiento físico y como consecuencia de cubrir el aumento de la demanda de oxígeno. Estimulados por este estudio decidimos analizar de nuevo las biopsias que habíamos recogido para

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.

el estudio transversal de los deportistas del equipo suizo de orientación de 1973 (Hoppeler, Lüthi et al., 1973), e hicimos un análisis estereológico del suministro capilar (Zumstein, Mathieu, Howald, & Hoppeler, 1983). Sorprendentemente, la densidad capilar (número de capilares/sección transversal de fibras) en los deportistas del equipo de orientación no era mayor a la densidad en hombres o mujeres no entrenados. Sin embargo, encontramos una relación significativa entre el VO_2 máx. y la relación CF (cantidad de capilares/cantidad de fibras). Este descubrimiento ambiguo nos llevó a un análisis de los problemas estereológicos asociados en la evaluación de la capilaridad en el tejido muscular (Mathieu, Cruz-Orive, Hoppeler, & Weibel, 1983). La estereología es un conjunto de herramientas matemáticas que permiten calcular los parámetros estructurales en 3 dimensiones, tales como volúmenes, superficies y longitudes desde sus representaciones en 2 dimensiones en secciones del tejido. Lo bueno de los parámetros estereológicos, es que se pueden derivar de los principios básicos, algo extraordinario en las ciencias biológicas. El inconveniente de obtener estimaciones estereológicas (o morfométricas) en el tejido muscular esquelético tiene que ver con la naturaleza altamente anisotrópica del músculo. En el tejido muscular *in vivo*, las fibras musculares esqueléticas aparecen como tubos (infinitamente) largos, rectos y paralelos, con los capilares moviéndose en el espacio entre estos tubos. Sin embargo, esta situación se complica cuando se analizan biopsias musculares: las fibras musculares se contraen debido a la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico; la orientación de la fibra muscular se pierde (parcialmente) en el proceso de la biopsia, y se produce una contracción del tejido durante la fijación del tejido. Esto significa, que en las biopsias del tejido muscular humano los parámetros deseados no se pueden evaluar con precisión (es decir, de una manera no sesgada).

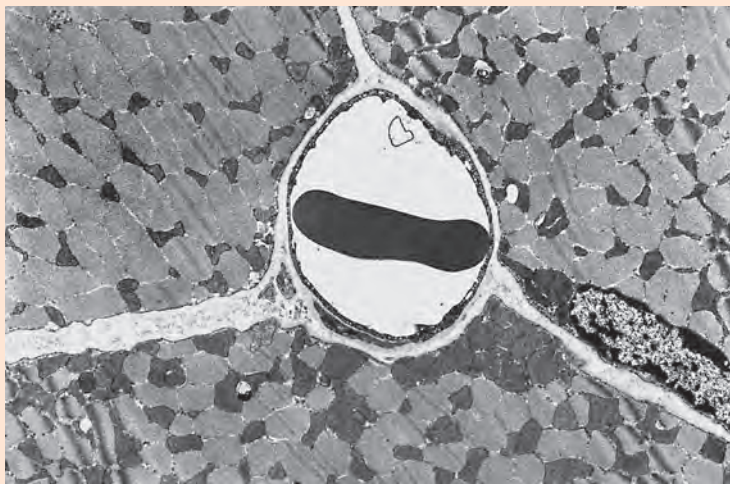


Figure 5
Micrograph of a muscle cross section including a capillary with an erythrocyte

Figura 5
Micrografía de una sección transversal del músculo incluyendo un capilar con un eritrocito

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 $VO_2\text{max}$ (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

Se podría decir que el parámetro más relevante que caracteriza la capilaridad es la longitud capilar. Como el diámetro capilar es relativamente uniforme, la longitud capilar permite el cálculo de la superficie capilar y de su volumen. Con el uso de estas variables, se pueden calcular y aplicar en modelos fisiológicos, algunas de las condiciones cruciales establecidas para el intercambio capilar del oxígeno y de los sustratos. La superficie capilar representa la interfaz de intercambio disponible entre las fibras musculares y el lecho capilar, mientras que el volumen capilar con el flujo sanguíneo muscular determina el tiempo de tránsito disponible para el intercambio capilar bajo las condiciones límite del VO_2 máx. (Kayar et al., 1992).

Suponiendo que los capilares son rectos y paralelos a las fibras musculares, la longitud capilar se puede calcular fácilmente y de manera eficiente a partir de unas secciones transversales del músculo. La longitud capilar por unidad de volumen de tejido muscular ($J_v(C, F)$; unidades: mm/mm^3) sería entonces, simplemente igual al número de capilares por unidad de área de la sección transversal del músculo ($N_A(c, f)$; unidades: mm^{-2} o mm/mm^3). Así, el cálculo total de la longitud de los capilares de un varón de unos 30 kilos de masa muscular, nos da un valor impresionante de unos 15.000 km. Sin embargo, como los capilares musculares no son tubos rectos, pero se mueven y entre-comunican en un cierto grado, este número debe multiplicarse por un factor adimensional de aprox. 1.3 por las biopsias musculares humanas. Es posible obtener estimaciones estereológicamente válidas de la longitud capilar, incluso en un material parcialmente anisotrópico tal como se procede en la toma de muestras de tejido muscular con una aguja de biopsia. Para ello habría que tomar una muestra de una sección IUR (independiente uniforme y al azar) de bloques de tejido muscular y aplicar la fórmula estereológica básica para calcular la longitud de la densidad de las estructuras isotrópicas (no orientadas). Lo hicimos en un estudio con el objetivo de estimar los flujos de sustrato en las especies atléticas y no-atléticas (Vock, Weibel et al., 1996). Sin embargo, el método IUR es laborioso y técnicamente difícil y por lo tanto se utiliza poco. En este contexto, se puede observar, también, que todas las estimaciones clásicas de la sección transversal de fibras musculares, descritas en prácticamente todos los estudios, están sesgadas hacia áreas de sección transversal demasiado grandes. Esto se debe a que, si una sección no es tomada perfectamente perpendicular al eje de la fibra muscular, los cálculos de la sección transversal de las fibras se sobrevaloran.

Utilizando herramientas estereológicas no tan perfectas no cabe duda alguna que el entrenamiento de resistencia aumenta la capilaridad. Sin embargo, todos están de acuerdo que el aumento de la densidad capilar es menor que el

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 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 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 max. Maximum fat

aumento del volumen mitocondrial (Saltin & Gollnick, 1983). El aumento menor de capilares (que caracterizan el suministro del oxígeno) en comparación con las mitocondrias (que caracterizan la demanda de oxígeno) ha sido bien establecido en estudios comparativos (Conley, Kayar, & Rosler, 1987). Mientras que a nivel de las mitocondrias, la demanda de oxígeno se puede caracterizar completamente con la variable estructural "volumen mitocondrial", este no es el caso de los capilares. Hemos podido demostrar que en los animales atléticos y sedentarios de la misma masa corporal (como los caballos *versus* novillos o perros *versus* cabras) había una diferencia de 2,5 veces en la demanda de oxígeno en las especies atléticas se manifestaba con más capilares y hematocritos más elevados. En el caso de los humanos, no se han establecido totalmente cuales son los factores que contribuyen para que coincida el suministro de oxígeno a la demanda de oxígeno, con el entrenamiento de resistencia.

Suministro de substrato y flujo de oxígeno

Sabemos que el entrenamiento de resistencia humano no sólo aumenta el VO_2 máx., sino que también aumenta la cantidad relativa y absoluta de los lípidos oxidados durante el ejercicio. En el plano estructural, esto se manifiesta con un volumen más grande de los lípidos intracelulares presentes en los atletas de resistencia entrenados (Hoppeler, Lüthi et al., 1973) y un incremento con el entrenamiento de resistencia (estudios de intervención de Hoppeler, Howald et al. 1985). Los lípidos intracelulares siempre se observan en forma de gotitas de lípidos en contacto con las mitocondrias (Vock, Hoppeler et al., 1996). Por lo tanto, se podría concluir que el área de contacto entre las gotas de lípidos y la mitocondria podría ser uno de los parámetros relevantes en la selección de los sustratos en un músculo en ejercicio.

Como se ha comentado anteriormente, en general, se considera que en última instancia, el flujo del oxígeno a través del sistema respiratorio y el metabolismo del oxígeno a nivel de las mitocondrias son los que determinan el VO_2 máx. de una persona. Sin embargo, esto no es un hecho evidente de inmediato, porque la limitación podría, en principio, ser el resultado de la limitación del sustrato en lugar de la limitación del oxígeno. Hemos estudiado con atención la posibilidad de limitación de los sustratos en el trabajo aeróbico utilizando la comparación de los perros atléticos con las cabras sedentarias (Taylor, Weibel et al., 1996). Se encontró una diferencia superior a 2 veces en el VO_2 máx. en las especies analizadas. La máxima oxidación de grasa se produjo en ambas especies a un 40% del VO_2 máx.

oxidation occurred in both species at 40% of VO_2 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 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 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 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

con la mayor parte de la energía suministrada por la oxidación de grasa con un entrenamiento a bajas intensidades. Con el aumento de la intensidad del entrenamiento por encima del 40%, la energía adicional provenía de la oxidación de los carbohidratos alcanzando niveles de oxidación máximos cuando se alcanzó la capacidad aeróbica (Roberts, Weber, Hoppeler, Weibel, & Taylor, 1996). Este patrón de reclutamiento de combustible parece ser general en los mamíferos y se aplica del mismo modo a los humanos; Brooks y Mercier (1994) han utilizado el término concepto de "intercambio" para describir este concepto de la utilización de sustratos con el aumento de la intensidad del ejercicio.

En un análisis más detallado usando técnicas adecuadas con indicios de localización, pudimos establecer que la utilización de hidratos de carbono y lípidos que proviene de fuentes vasculares es limitada y alcanza su máximo con ejercicio a bajas intensidades (<40% del VO_2 máx.; Weber, Roberts, Vock, Weibel, & Taylor, 1996; Weber, Brichon et al., 1996). Este déficit de reservas de combustible durante un entrenamiento de alta intensidad se compensa por un aumento en el uso de hidratos de carbono (glucógeno) y lípidos, almacenados intracelularmente. Estos resultados corresponden a los datos obtenidos en humanos utilizando técnicas de isótopos estables (Romijn et al., 1993). Todos estos datos indican que, efectivamente, el transporte y la utilización del oxígeno es la parte fundamental en la determinación del VO_2 máx. y los sustratos, ya que los hidratos de carbono y lípidos están en las células musculares, en las inmediaciones de las mitocondrias. El suministro vascular de sustratos es posible solo durante el entrenamiento a bajas intensidades. Esto también significa que el entrenamiento de media o de alta intensidad siempre agotaría las reservas intracelulares de sustratos que a continuación necesitarían recargarse durante las horas de descanso.

Nuestros estudios comparativos sobre las condiciones para la utilización de sustratos en las especies atléticas y sedentarias provocaron nuestro interés en la modificación de la utilización de sustratos en atletas humanos (Vogt et al., 2003). Se estudiaron 11 duatletas que fueron sometidos durante 4 semanas de manera aleatoria a una dieta alta en grasas (53% de calorías de grasa) y 4 semanas a una dieta baja en grasa (<20% de calorías de grasa) separadas por un período de 2 semanas neutras de limpieza. La VO_2 máx. en un ejercicio de intensidad progresiva y el tiempo de la carrera en el test de media maratón con ambos períodos dietéticos se mantuvieron sin cambios. Del mismo modo, el contenido mitocondrial y el glucógeno del músculo vasto lateral se mantuvo sin cambios. Por el contrario, el contenido de lípidos intramiocelulares aumentó más del doble y el cociente del intercambio respiratorio se redujo de manera significativa lo que indicó un mayor uso

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_2 max 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_2 max, 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

de la grasa como sustratos después del período de la dieta alta en grasas. El aumento en la oxidación de grasas en reposo fue de 35 %, mientras que el 75 % del VO_2 máx. el aumento de la oxidación de grasas era todavía mayor al 15 %. Este estudio mostró que la selección de sustratos del músculo en ejercicio también era bastante modificable y respondía rápidamente a cambios en la composición de sustratos de la dieta.

Las miofibrillas y la fuerza

Un entrenamiento repetido de “alta resistencia” con cargas bajas/muchas repeticiones: conduce a un aumento del VO_2 máx., a adaptaciones centrales como un aumento del volumen sistólico y en la periferia, un aumento de las mitocondrias y de los capilares en los músculos entrenados. Por el contrario, un entreno de “resistencia” con cargas altas/pocas repeticiones conduce a un aumento de la fuerza muscular y de la masa muscular, pero provoca mínimos cambios en los sistemas centrales responsables del suministro de oxígeno. Con el objetivo de describir la especificidad estructural del entrenamiento de fuerza se hizo un estudio de entrenamiento de 6 semanas, sometiendo personas previamente no entrenadas, a un programa de entrenamiento completo de todo el cuerpo (Lüthi et al., 1986). La fuerza de los músculos extensores de la rodilla aumentó un 17 % sobre todo durante las primeras 3 semanas del entrenamiento, en cuanto al aumento de la sección transversal muscular (estimada por tomografía computarizada) este fue mínimo, presuntamente debido a las adaptaciones neuronales. Se observó un aumento significativo del 9 % en la sección transversal del músculo cuádriceps sobre todo en la segunda parte del período de entrenamiento. Las biopsias musculares indicaron una disminución relativa de la densidad del volumen mitocondrial y sin cambios en la densidad del volumen de las miofibrillas. El cálculo absoluto de los volúmenes miofibrillares y mitocondriales indicó, que el volumen absoluto de las mitocondrias se mantuvo sin cambios, mientras que el volumen absoluto de las miofibrillas se incrementó, lo que representa cuantitativamente el aumento del volumen muscular (Hoppeler 1986). Nuestros resultados son ampliamente compatibles con estudios similares, por lo que el entrenamiento de fuerza provoca cambios en el tejido muscular esquelético humano (Abernethy, Jürimäe, Logan, Taylor, & Thayer 1994; Folland & Williams 2007).

Los mecanismos de la plasticidad muscular

El aspecto importante de todos los estudios morfométricos sobre las adaptaciones del tejido muscular con diferentes

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

protocolos de entrenamiento reside en el mensaje claro que las intervenciones en el entrenamiento conducen a cambios muy específicos en la composición del tejido muscular. El entrenamiento de resistencia conduce a un aumento en las estructuras implicadas en el suministro de oxígeno (los capilares) y a la demanda de oxígeno (las mitocondrias). Además, se observa por lo menos, una tendencia de utilización de las fibras musculares lentas que aumentan la economía del gasto muscular (Fitts & Widrick, 1996). El entrenamiento de resistencia no tiene un efecto importante sobre el volumen muscular, sin embargo la composición del tejido muscular cambia de manera cualitativa en solo pocas semanas. Como se ha explicado anteriormente, se puede observar un aumento de 40% del volumen mitocondrial en sujetos no entrenados que sometidos a un programa de entrenamiento intensivo de 6 semanas. Un aumento del 40% de las mitocondrias representa una hazaña prodigiosa de síntesis del tejido muscular. Como las mitocondrias contienen más de 1000 proteínas diferentes tanto codificadas en el núcleo como en el genoma mitocondrial, esto requiere una masiva regulación coordinada de la maquinaria implicada en el mantenimiento del músculo. También nos podemos preguntar cómo un crecimiento miofibrilar de 10% puede suceder en las fibras musculares como consecuencia de un entrenamiento de fuerza en sólo 6 semanas de duración. Sin embargo, se ha establecido firmemente que los cambios de rendimiento funcional después de los periodos de entrenamiento fueron cuantitativamente relacionados con los cambios estructurales del tejido muscular. Hasta alrededor de 1990, la fisiología del ejercicio utilizaba métodos esencialmente descriptivos para explicar que el entrenamiento provocaba la plasticidad fenotípica del tejido muscular. No había herramientas disponibles para poder estudiar la relación entre las variables funcionales del entrenamiento (duración, frecuencia, intensidad del ejercicio) y las modificaciones estructurales para explicar las mejoras funcionales observadas.

Con el avance del tiempo, la biología molecular proporcionó el marco intelectual y también las técnicas, que permitieron los análisis mecanicistas del entrenamiento. Toda una gama de herramientas estaba disponible para analizar el flujo de información (en forma de RNA) a partir del material genético (DNA) en el núcleo de la maquinaria que produce las proteínas estructurales relevantes para las mitocondrias o miofibrillas en las células musculares. En esa época, los fisiólogos del ejercicio tenían que unirse y colaborar con los biólogos moleculares y buscar las conexiones entre el estrés repetido de las sesiones de entrenamiento con el rendimiento y los cambios estructurales observados como consecuencia. Aceptando la biología molecular como herramienta para comprender la relación

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

entre la práctica del ejercicio físico y la adaptación fenotípica del tejido muscular provocó una explosión de conocimientos sobre los mecanismos básicos de respuesta de un sistema vivo al estrés externo. La disponibilidad del tejido muscular a través de muestras de biopsia, así como su adaptabilidad bien definida hizo del tejido muscular esquelético un modelo ideal para estudiar la expresión génica humana en condiciones experimentales definidas.

Identificamos 4 estímulos principales a los cuales el músculo está sometido cada vez que entrenamos (Hoppeler & Flück, 2003). Estos estresores principales del músculo, son la carga mecánica, la alteración metabólica, los ajustes hormonales y la activación neuronal; este último provoca que el Ca^{++} cambie en las fibras musculares activadas. En el entrenamiento de resistencia, el estrés es predominantemente mecánico, con alteraciones metabólicas pequeñas y de corta duración. Del mismo modo, la reacción hormonal y neuronal al entrenamiento de resistencia es completamente diferente al entrenamiento de "alta resistencia". El entrenamiento de alta resistencia consiste en un repetido estrés mecánico de baja carga pero de larga duración. La alteración metabólica en términos de niveles altos de lactato, pH bajo del músculo y un desequilibrio energético masivo (es decir, niveles de AMP elevados) persiste durante largos periodos de tiempo.

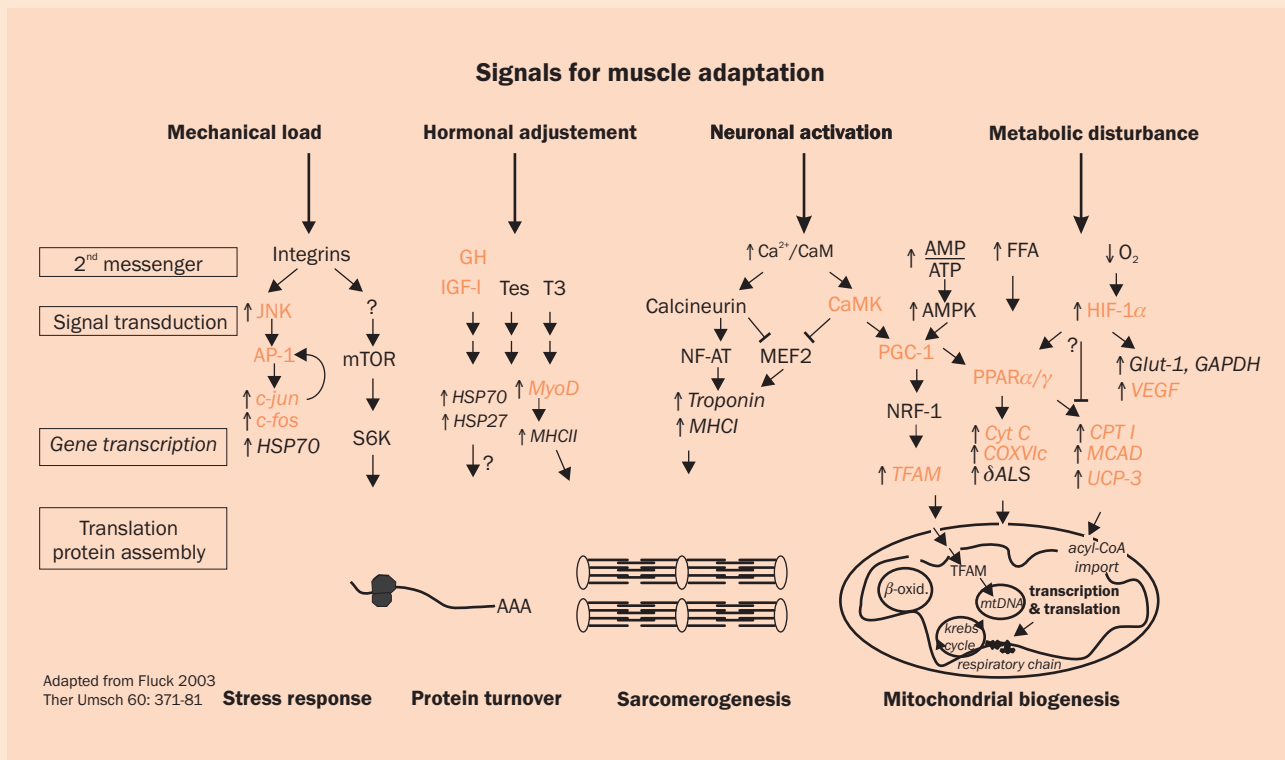


Figure 6. Primary muscle stressors (from Flück 2003)

Figura 6. Estímulos (estresores) musculares primarios (de Flück 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

Estos diferentes patrones de estrés pueden ser detectados por las fibras musculares y son la razón de la plasticidad fenotípica distinta que hemos descrito para estas modalidades de entrenamiento (ver Hoppeler, Baum, Lurman, & Mueller, 2011 para más detalles).

El entrenamiento de alta resistencia resulta en la señalización inmediata y prolongada en los músculos esqueléticos. Las fibras musculares tienen una red de señalización compleja con múltiples puntos de entrada. La señalización resulta principalmente en una suprarregulación transcripcional coordinada con una multitud de genes implicados en la respuesta a este tipo de entrenamiento. Esta regulación coordinada transcripcional de los genes estructurales conduce a la acumulación de proteínas musculares específicas y permite un mejor rendimiento del músculo cuando es sometido a condiciones de alta resistencia. La señalización de Ca^{2+} , asociada al ejercicio, así como el cambio del estado de energía del músculo, detectado por el sistema de la AMPK (adenosine-5'protein monophosphate-activated kinase) parecen ser los principales determinantes de la red de señalización. La señalización ROS/redox y la detección de hipoxia pueden modificar y ajustar la respuesta del músculo a la resistencia en función de las señales ambientales y la intensidad del ejercicio. El proceso de señalización es además sensible a la disponibilidad del sustrato, por medio del cual, los ácidos grasos utilizan el sistema PPAR, mientras que el contenido de glucógeno muscular puede modular la señalización de AMPK directamente. El aumento de los niveles de adrenalina circulante relacionados con el ejercicio parecen ser importantes para la inducción de la angiogénesis. Todas las vías de regulación parecen converger hacia el co-activador transcripcional PGC-1 α que se une y activa distintos factores de transcripción y receptores nucleares. PGC-1 α ayuda la remodelación de la cromatina facilitando de este modo la transcripción. PGC-1 α interactúa además con los mecanismos de *splicing* coordinando los procesos de transcripción, así como los de post-transcripción. Podemos considerar el PGC-1 α como el principal integrador de la reacción transcripcional del tejido muscular, en respuesta a una actividad de resistencia. Mientras que los cambios fenotípicos provocados por el entrenamiento de resistencia, son principalmente mediados con la transcripción, el entrenamiento de fuerza afecta principalmente a la transformación. El principal integrador de las múltiples cascadas utilizadas en la señalización del entrenamiento de fuerza es mTOR (mammalian target of rapamycin). Podemos distinguir tres grandes activadores de mTOR. Los factores de crecimiento como la insulina y la hormona del crecimiento actúan a través de la vía IGF-R (receptor de insulina) – Akt (Protein kinase

(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.

*B, PKB). Las señales de estrés mecánico activan vías dependientes e independientes del Akt. Señales nutricionales, tales como la presencia de leucina y otros aminoácidos actúan directamente sobre mTOR. mTOR aumenta la síntesis de proteínas, mediante las fases de iniciación y elongación del proceso de traducción. En la señalización de la fuerza hay también reguladores negativos de la mTOR. Niveles celulares energéticos disminuyen la activación de mTOR. La miostatina como un importante factor procaquético del músculo reprime el mTOR directa e indirectamente. El crecimiento hipertrófico de tejido muscular que depende de la síntesis de las proteínas, está limitado por el tamaño de dominio nuclear. El crecimiento de la fibra más allá del 20% es posible con la implicación de las células satélite. Las células satélite pueden ser activadas por numerosos factores de crecimiento (FGF, HGF, BMP, etc.), así como por factores de regulación miogénica MyoG (*myogenin*) y MyoD (factor de diferenciación miogénica). El aumento crónico de bajo nivel de citoquinas inflamatorias como la TNF- α y la IL-6 son fuertes represores de la cascada de señalización de Akt-mTOR y de los factores de regulación miogénica. Los andrógenos parecen interferir con las múltiples vías de señalización y mejorar el metabolismo celular del músculo y también el crecimiento muscular. Generalmente, la plasticidad muscular fenotípica con el entrenamiento de fuerza está regulada principalmente por la mTOR y sus efectos sobre la maquinaria de transformación en la fibra muscular, así como la activación de las células satélite que representa el reclutamiento de DNA a las células musculares.*

En general, los últimos 25 años de investigación molecular de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta al entrenamiento han sido muy productivos. Las vías reguladoras de la respuesta al entrenamiento de resistencia y de fuerza se han explorado y se han identificado los principales protagonistas. Ahora sabemos que el ejercicio de resistencia funciona principalmente a través de la modulación transcripcional, mientras que el entrenamiento de fuerza funciona a través de la regulación de la transformación. Ambas vías son extremadamente complejas, con múltiples puntos de entrada, con muchas cadenas de señalización paralelas, con interconexiones y también en circuitos de prealimentación y de retroalimentación. Estas redes de señalización son muy robustas y difíciles de distinguirlas experimentando. Para estos experimentos es necesario el uso de sistemas modelo tales como animales transgénicos y cultivos celulares que se pueden modificar adecuadamente. La enorme complejidad de la red de regulación que controla el fenotipo en las fibras musculares es imponente y es cierto, que estamos lejos de tener una comprensión completa de la misma.

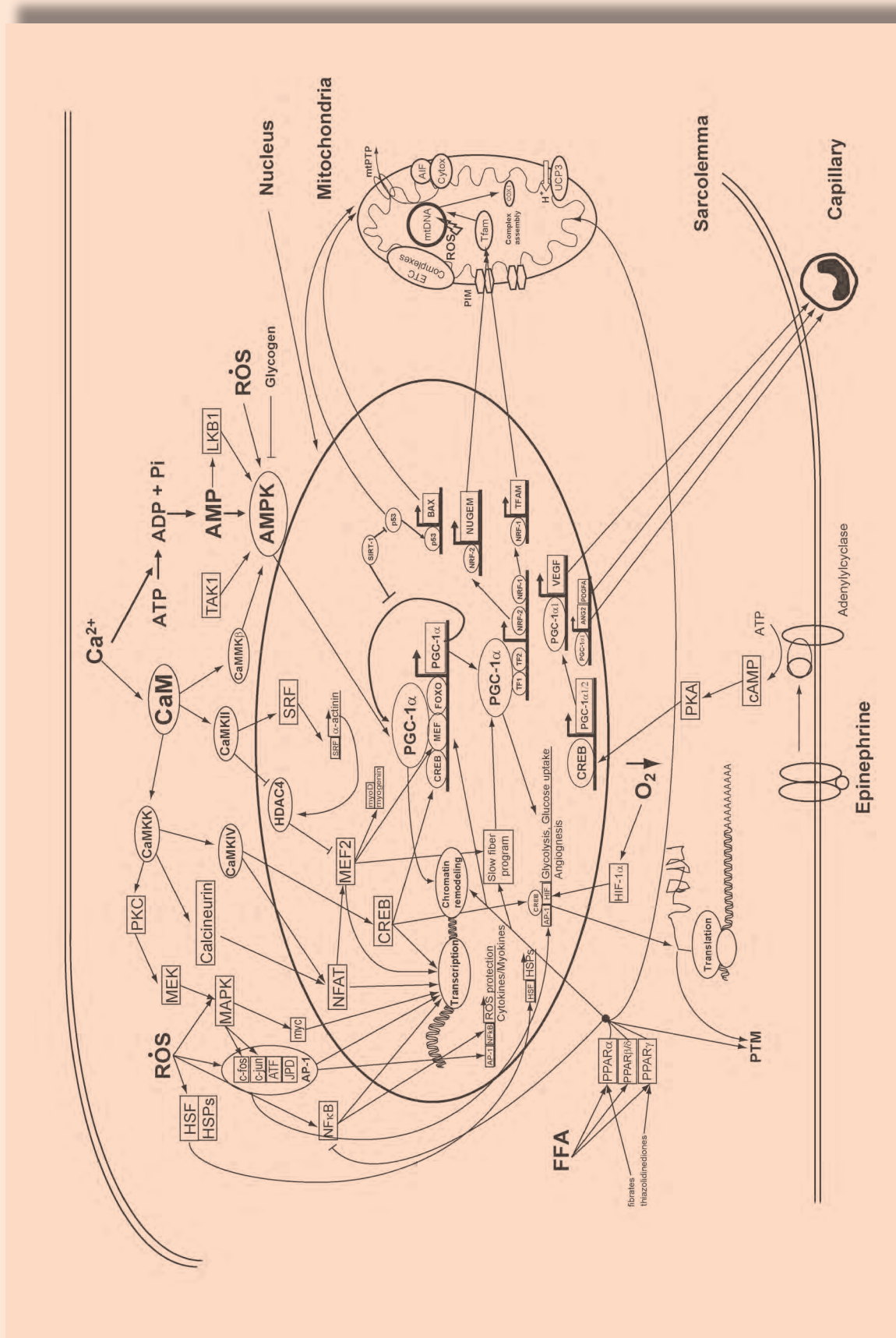


Figure 7. Red de señalización en el tejido muscular en caso de las adaptaciones de entrenamiento de alta resistencia (según Hoppeler, Baum et al 2011)

Figure 7. Signaling network in muscle tissue as relevant for endurance adaptations (after Hoppeler, Baum 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 futuro de la investigación del músculo y de la ciencia del ejercicio

He vivido personalmente la transición de la ciencia del ejercicio desde un estudio descriptivo de los fenómenos funcionales (y estructurales) importantes para el rendimiento físico humano, al de una ciencia que busca explicaciones mecanicistas de estos mismos fenómenos. ¿A partir de aquí, cuál es el futuro?

En realidad, hay niveles inexplorados del control molecular sobre la adaptabilidad fenotípica que requieren investigación. Uno de los mecanismos de interés potencial de los científicos que investigan el ejercicio es la epigenética es decir, el control de la expresión génica y por lo tanto el fenotipo más allá del DNA. El mecanismo epigenético puede modificar el genoma de una manera relevante funcionalmente, sin producir cambios en la secuencia de nucleótidos. Esto ocurre a través de mecanismos como la metilación del DNA y la de-metilación o modificación de las histonas que influyen en el uso de DNA a través de las proteínas represoras. Algunas de las modificaciones epigenéticas del genoma son estables durante largos períodos de tiempo (memoria celular) o pueden incluso (raramente) ser heredables (Ehlert, Simon, & Moser, 2013). Estudiar los cambios epigenéticos del genoma a través del ejercicio físico puede conducir a una mejor comprensión de cómo el ejercicio a edad temprana puede cambiar la actitud deportiva y el rendimiento en una edad más avanzada. Los cambios epigenéticos también pueden ser responsables de los efectos del ejercicio a largo plazo, para la salud, para el fenómeno del entrenamiento-reentrenamiento y para las disfunciones musculares relacionadas con enfermedades (Barreiro & Sznajder 2013; Kirchner, Osler, Krook, & Zierath, 2013).

Otra área de gran desarrollo de la ciencia del ejercicio es la exploración de los mecanismos que vinculan el ejercicio físico a la salud y el bienestar. En este contexto Pedersen et al. (2003) publicaron un artículo innovador que comprueba el hecho que los músculos producen sustancias antiinflamatorias durante el ejercicio físico. Los autores dieron el término de *myokines* para los péptidos liberados por los músculos durante la actividad física. Actualmente hay más de 10 *myokines* identificados que cumplen diferentes funciones, principalmente tejidos que comunican entre sí, con el tejido adiposo, con el cerebro, etc. algunos de los cuales tienen efectos antiinflamatorios. Con la aparición del concepto de *myokines* la promoción diversa de los efectos de la actividad muscular sobre la salud, se puede abordar ahora de manera experimental, y son susceptibles a un escrutinio científico mecanicista (Pedersen & Febbraio 2012). La ciencia del ejercicio

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

debe adoptar estos nuevos conceptos como ciencia, que ante todo, explora las condiciones relacionadas con el bienestar del ser humano durante la actividad física.

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

Referencias

- 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 previo a la impresión].
- 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. 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

- 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. En 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. En 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