



**universidad
de león**

Desarrollo de un modelo de ejercicio para la promoción del turismo en Canarias dirigido a la lucha contra la obesidad

PROGRAMA DE DOCTORADO: Ciencias de la Actividad Física y el Deporte

Ismael Pérez Suárez

**DIRECTORES: Dra. Cecilia Dorado García
Dr. José Antonio López Calbet**

Índice

Dedicatoria.....	5
Agradecimientos	6
Fuentes de financiación	9
Lista de publicaciones originales.....	10
Abreviaturas.....	11
Resumen	15
Abstract.....	18
1. INTRODUCCIÓN.....	21
1.2. Turismo Médico y de Salud	21
1.3. Dieta y ejercicio para inducir pérdida de peso	22
1.4. Diseño de un producto turístico dirigido a producir adelgazamiento.....	25
1.5. Factibilidad del ejercicio prolongado con restricción calórica severa como modelo de ejercicio.....	26
1.6. Preservación de la masa magra durante la restricción calórica	27
1.7. Fundamentación científica de los efectos metabólicos y moleculares del ejercicio prolongado combinado con restricción calórica severa	29
2. OBJETIVOS.....	35
3. HIPÓTESIS.....	38
4. MATERIAL Y MÉTODOS	40
4.1. Sujetos.....	40
4.2. Protocolo experimental.....	41
4.3. Evaluación de la actividad física, la nutrición y la composición corporal	45
4.4. Medición del pico de consumo de oxígeno.....	45
4.5. Análisis bioquímicos y hormonales	46
4.6. Biopsias musculares, extracción de proteínas totales, transferencia de Western, PCR y composición de la cadena pesada de la miosina.....	48
4.7. Materiales y anticuerpos.....	50
4.8. Material y métodos empleados para establecer la confiabilidad y validez del analizador portátil de gases COSMED K5	51
5. RESULTADOS	55
5.1. Composición corporal	55
5.2. Pico de potencia (W _{peak}) y consumo pico de O ₂ (VO ₂ pico) durante el pedaleo	56
5.3. Pico de potencia (W _{peak}) y consumo pico de O ₂ (VO ₂ pico) durante el ejercicio de pedaleo de brazos	59
5.4. Cambios metabólicos y hormonales	59
5.5. Composición de cadenas pesadas de miosina en las biopsias musculares y capacidad máxima de oxidación de grasas	64

5.6. Receptores de leptina	65
5.7. JAK2	66
5.8. STAT3.....	68
5.9. PTP1B y SOCS3	68
5.10. Correlaciones.....	70
5.11. Validez y fiabilidad del analizador portátil de gases COSMED K5	72
6. DISCUSIÓN.....	76
7. CONCLUSIONES	88
8. CONCLUSIONS	91
9. PERSPECTIVAS DE FUTURO	94
10. BIBLIOGRAFÍA.....	96

Dedicatoria

A **MI PADRE**, el cual siempre ha estado muy cerca de mí y me da MUCHA FUERZA y ánimo para seguir esforzándome cada día.

A **MI MADRE**, a la que le debo TODO. Siempre me apoya y me anima a que siga por el camino del trabajo duro y de la formación.

LOS DOS siempre me han dado TODO Y MÁS, sin pedir nunca nada a cambio. Sin ellos este trabajo no habría sido posible.

A **MIS ABUELOS** por todo lo que me han dado siempre, que es muchísimo.

A mi **familia**.

Agradecimientos

Al **Dr. José Antonio López Calbet**, profesor que ya marcó mi porvenir durante mis estudios en la licenciatura y quien desde el primer momento me abrió las puertas del laboratorio y me dio la oportunidad de aprender y trabajar en su grupo de investigación. Gracias por el apoyo, por la guía y por permitirme aprender sobre investigación al más alto nivel. Gracias por darme la oportunidad de formarme en otro grupo de investigación. Gracias por tu dedicación en esta tesis. Gracias por confiar en mí.

A la **Dra. Cecilia Dorado García** por tu guía y apoyo durante estos años. Desde la carrera me transmitió como nadie la curiosidad y el interés por indagar en el conocimiento y tratar de ir un poco más allá. Gracias por transmitirme la importancia de la parte docente y transmitir a los estudiantes los últimos conocimientos frutos de las investigaciones más recientes.

Al **Dr. Alfredo Santana**, por tus enseñanzas en la parte más bioquímica y biológica. Es todo un privilegio aprender de un investigador de tu talla. La meticulosidad, el orden y el rigor científico sumado a los valores humanos y personales.

Al profesor **Dr. Juan José González Henríquez**, por dar luz en las cuestiones de estadística. El asesoramiento ha sido fundamental y la predisposición total.

Gracias al resto de profesores que forman parte del equipo de investigación: **Dr. José Antonio Serrano Sánchez, Dr. Joaquín Sanchís Moysi, Dr. Javier Chavarren Cabrero, Dr. Rafael Arteaga Ortiz**. De todos he tenido oportunidad de aprender mucho a lo largo de este período.

Gracias a **José Ricardo Navarro de Tuero**, por su paciencia en mis inicios en el laboratorio y por el innumerable apoyo logístico y humano que siempre me has dado en todo este tiempo. Estuviste desde el principio hasta el final. Gracias por todo.

Gracias a la **Dra. Amelia Guadalupe Grau** de quien pude aprender mis primeras técnicas de laboratorio y las primeras normas importantes en el trabajo.

Al **Dr. Jesús G. Ponce González**, referente y parte fundamental en mis primeros pasos en la investigación y en el laboratorio. Con él aprendí a trabajar duro y en equipo. Siempre fue fácil trabajar contigo.

Al **Dr. David Morales Álamo**, quien cuando entré en el laboratorio estaba finalizando su tesis y quien posteriormente supervisó mi trabajo en el laboratorio durante buena parte de mi formación. Su pasión y dedicación infatigable al trabajo y la importancia de ser metódico y trabajar duro siempre.

Gracias a mis primeros compañeros “de batalla” en el laboratorio el **Dr. José Losa Reyna, Jaime de La Calle Herrero y el Dr. Rafael Sánchez de Torres Peralta** quienes hacían el doctorado y trabajaban arduamente cuando comencé y durante la mayor parte de mi periodo en el laboratorio. De ellos he aprendido mucho y juntos hemos pasado muchísimos buenos y no tan buenos momentos en el trabajo. De todos aprendí y sigo aprendiendo y tengo la suerte de tenerlos como compañeros y amigos.

Gracias a **Arima Santana Fernández**, excelente técnico de laboratorio y mejor compañera. Siempre, por dura que fuera la tarea, fue fácil trabajar contigo. El orden, la limpieza y la rigurosidad en el trabajo siempre acompañada del buen humor y la sonrisa.

Gracias a mis actuales compañeros de laboratorio **Marcos Martín Rincón, Mario Pérez Valera, Miriam Gelabert Rebato y al Dr. David Curtelin**. Todos entraron en el laboratorio con muchas ganas y energías renovadas. El trabajo duro y el

compañerismo son valores con los que entraron de lleno en el grupo de trabajo. Ha sido y es un placer trabajar y compartir momentos con todos.

Gracias al personal de administración y servicio del Edificio de Educación Física de la ULPGC: **Anselmo, Mila, Maribel, Macu, Julio.**

Gracias a los compañeros que han pasado de estancia por el grupo, **Fernando Pareja Blanco, David Rodríguez Rosell, Ibai Garcia Tabar, Alberto Pérez López, Evgenia Cherouveim.** De todos me llevo un gran aprendizaje y han sido parte importante de estos años de formación.

Al profesor **Ola Hansson** por incorporarme en su grupo de trabajo en el Lund University Diabetes Centre de Malmö e integrarme en el gran equipo del profesor **Leif Groop.** Gracias a **Esa Laurila** por todo lo que me enseñó sobre cultivo celular y todos los laboratorios del centro. Gracias a **Ola Ekström** y **Dammon Tojjar** por acogerme como uno más y enseñarme tanto en mi período de estancia predoctoral. Gracia a **Ulrika Blom-Nilson** por toda su ayuda, asesoramiento y orientación en mi estancia en Malmö.

A **Carla Ramos Díaz,** comenzamos nuestra andadura justo cuando comencé en el doctorado y siempre estuviste ahí durante más de 5 años. El destino nos separa, pero sin tu amor, apoyo, paciencia y comprensión en los momentos más difíciles de este período, no habría podido llegar al final de esta etapa. Vivir y convivir con un doctorando no es fácil y tú lo hiciste increíblemente bien y fácil. Tu paso por mi vida permanece imborrable en mi memoria y el trabajo de estos años lleva mucho de ti.

Fuentes de financiación

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

Los estudios que conforman la tesis han sido financiados por los siguientes proyectos de investigación:

Proyecto DEP2010-21866, Influencia del ejercicio físico, la FiO₂ y el estrés oxidativo en la señalización (I.P.: Dra. Cecilia Dorado García)

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

Proyecto Ministerio de Economía y Competitividad (PI14/01509 y FEDER), Viabilidad y sostenibilidad del adelgazamiento mediante tratamiento intensificado en pacientes con sobrepeso u obesidad: mecanismos neuroendocrinos y moleculares (I.P.: Dr. Pedro de Pablos Velasco y Dr. José Antonio López Calbet)

Lista de publicaciones originales

La presenta tesis se basa:

Artículo I (Calbet et al. 2015)

Calbet JAL, Ponce-Gonzalez JG, Perez-Suarez I, de la Calle Herrero J, Holmberg H-C (2015). A time-efficient reduction of fat mass in 4 days with exercise and caloric restriction. *SJMSS*

Artículo II (Calbet et al. 2017)

Calbet JAL, Ponce-Gonzalez JG, de La Calle-Herrero J, Perez-Suarez I, Martin-Rincon M, Santana A, Morales-Alamo D, Holmberg H-C (2017). Exercise preserves lean mass and performance during severe energy deficit: the role of exercise volume and dietary protein content. *Frontiers in Physiology* (Aceptado)

Artículo III (Perez-Suarez et al. 2017)

Perez-Suarez I, Ponce-Gonzalez JG, de La Calle-Herrero J, Losa-Reyna J, Martin-Rincon M, Morales-Alamo D, Santana A, Holmberg H-C, Calbet JAL (2017). Severe energy deficit up-regulates leptin receptors, leptin signalling and PTP1B in human skeletal muscle. *JAP* (En revisión)

Artículo IV (Perez-Suarez et al. 2017)

Perez-Suarez I, Fezzardi C, Martin-Rincon M, Perez-Valera M, Gelabert-Rebato M, Galván V, Aleman S, Calbet JAL, Morales-Alamo D, Dorado-Garcia C (2017). Accuracy and precision of the COSMED K5 portable analyzer. (Pendiente de ser enviado)

Abreviaturas

ACCB: Acetil-Coenzima A carboxilasa beta

Akt: Proteína quinasa B

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BCAA: Aminoácidos de cadena ramificada, del inglés “Branched-Chain Amino Acid”

CCC: Coeficiente de correlación de concordancia

CV: Coeficiente de variación

DXA: Absorciometría Fotónica Dual de Rayos X, del inglés “Dual Energy X-Ray Absorptiometry”

EAA: Aminoácidos esenciales, del inglés “Essential Amino Acid”

EE: Gasto energético, del inglés “Energy Expenditure”

FAI: Índice de andrógenos libres, del inglés “Free Androgen Index”

FAO: Oxidación de ácidos grasos, del inglés “Fatty Acid Oxidation”

FeCO₂: Fracción espiratoria de CO₂

FeO₂: Fracción espiratoria de oxígeno

FFM: Masa libre de grasa, del inglés “Fat Free Mass”

FiCO₂: Fracción inspiratoria de CO₂

FiO₂: Fracción inspiratoria de oxígeno

GLUT4: Proteína transportadora de glucosa 4

HDL: Lipoproteínas de alta densidad, del inglés “High Density Lipoproteins”

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia, del inglés “High Performance Liquid Chromatography”

IC: Intervalo de confianza

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico 1, del inglés “Insulin-like Growth Factor 1”

IMC: Índice de masa corporal

Índice C/FT: Índice cortisol/testosterona libre

IPAQ: Cuestionario Internacional de Actividad Física, del inglés “International Physical Activity Questionnaire”

IR β : Receptor de insulina, del inglés “Insulin Receptor”

JAK2: Proteína quinasa Janus 2

Kcal: kilocaloría

kDa: Kilodalton

kJ: Kilojulio

LCD: Dieta baja en calorías, del inglés “Low Calorie Diet”

LDL: Lipoproteínas de baja densidad, del inglés “Low Density Lipoproteins”

LM: Masa magra, del inglés “Lean Mass”

MHC: Cadena pesada de miosina, del inglés “Myosin Heavy Chain”

min: minuto

mM: milimolar

nm: nanómetro

OBR: Receptor de leptina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “Polimerase Chain Reaction”

PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

RER: Cociente respiratorio, del inglés “Respiratory Exchange Ratio”

rpm: revoluciones por minuto

SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales, del inglés “Sex Hormone Binding Globulin”

SOCS3: Supresor de la señalización de citoquinas 3

STAT3: Proteína transductor de señal y activador 3

TEE: Gasto energético total, del inglés “Total Energy Expenditure”

Thr: Residuo de treonina

TT: Testosterona total

Tyr: Residuos de tirosina

VCO $_2$: Producción de dióxido de carbono

V $_E$: Ventilación

V_E/VO_2 : Equivalente ventilatorio para el CO_2

V_E/VO_2 : Equivalente ventilatorio para el oxígeno

VLCD: Dieta muy baja en calorías, del inglés "Very Low Calorie Diet"

VO_2 : Consumo de oxígeno

VO_{2max} : Consumo máximo de oxígeno

VO_{2peak} : Consumo de oxígeno pico

V_T : Volumen tidal o corriente

W: Vatios

W_{peak}: Potencia pico

μg : microgramo

RESUMEN

Resumen

El objetivo principal de esta tesis ha sido desarrollar un nuevo modelo de ejercicio para la promoción del turismo en Canarias dirigido a la lucha contra la obesidad y fundamentarlo científicamente. El mayor esfuerzo se ha dirigido a demostrar que es posible para seres humanos con sobrepeso someterse a programas de ejercicio de alto volumen pero baja intensidad, de forma segura y consiguiendo efectos beneficiosos para la salud duraderos en el tiempo. Esta tesis se compone de cuatro estudios, dos publicados, uno en revisión con cambios menores y otro artículo que está pendiente de ser enviado a publicar. En el primer artículo "A time-efficient reduction of fat mass in four days with exercise and caloric restriction" se determinó si es posible conseguir una reducción significativa de grasa corporal en cuatro días combinando una dieta muy baja en calorías con ejercicio prolongado, para inducir un déficit energético de 5000 Kcal/día. En este estudio participaron 15 hombres con sobre peso u obesidad. Los voluntarios perdieron 2.1, 2.8, 3.8, and 1.9 kg de grasa ($P < 0.05$), tras cuatro días de déficit severo, tres días de dieta isocalórica, un mes de actividad normal no controlada y un año después, respectivamente. Aproximadamente $2/3$ de ésta pérdidas de grasa procedieron del tronco. Estos cambios de la composición corporal se acompañó de reducciones de los niveles en suero de glucosa, insulina, HOMA, cortisol, ácidos grasos libres, LDL y colesterol total, mientras que los triglicéridos disminuyeron, inmediatamente después de la fase de alto déficit energético. Este estudio demostró que se puede conseguir un descenso de grasa corporal clínicamente relevante en cuatro días, acompañado de una mejora del perfil lipídico. En el segundo estudio titulado "Exercise preserves lean mass and performance during severe energy deficit: the role of exercise volume and dietary protein content" se determinó la importancia que tiene el volumen de ejercicio y la ingestión de una pequeña cantidad de proteínas en el mantenimiento de la masa magra durante el déficit energético severo que provoca este tipo de intervención. Para ello, durante la fase de déficit energético severo se administraron 0.8 g/kg de peso corporal/día de azúcar ($n=7$) o proteína de suero de leche ($n=8$). La masa magra libre de grasa disminuyó un 57 y 29% en el brazo ejercitado (45 min/día) y en las piernas (8 h/día), respectivamente ($P=0.05$). La pérdida de masa magra se recuperó parcialmente tras tres días de dieta isocalórica. Estos cambios se asociaron a un ligero deterioro de la capacidad de rendimiento que fue más acusado en el grupo que tomó proteínas comparado con el grupo que ingirió azúcar. Se observó una relación lineal entre los cambios de masa magra y los cambios en el índice cortisol/testosterona. Este estudio ha

demostrado que los músculos sometidos a un mayor volumen de ejercicio durante la restricción calórica pierden menos masa magra, sin que la ingestión aislada de proteínas ofrezca ninguna ventaja. En el tercer estudio se determinaron en biopsias musculares obtenidas de ambos deltoides y del vasto lateral de una de las extremidades inferiores los efectos de la intervención sobre el sistema muscular de señalización por leptina. El estudio demostró que los receptores musculares de leptina y la cascada de señalización por leptina están aumentados en el músculo esquelético humano durante el déficit energético severo. Este efecto es independiente de la ingestión de azúcar o proteínas de suero de leche, no obstante, la ingestión de proteínas atenuó parcialmente la estimulación de la cascada de activación de la cascada de señalización por leptina. Finalmente en el cuarto estudio titulado “Accuracy and precision of the COSMED K5 portable analyzer”, se demostró que es posible medir con exactitud y precisión el coste energético durante caminatas prolongadas usando un analizador portátil de gases de última generación.

ABSTRACT

Abstract

The main objective of this thesis was to develop a new model of exercise for the promotion of tourism in the Canary Islands aimed at the fight against obesity and to substantiate it scientifically. The greatest effort has been made to demonstrate that it is possible for overweight humans to undergo high volume but low-intensity exercise programs safely and to achieve long-lasting health benefits. This thesis consists of four studies; two published, one under revision with minor changes and another article that is pending to be sent for publication. In the first article "A time-efficient reduction of fat mass in four days with exercise and caloric restriction" it was determined if it is possible to achieve a significant reduction of corporal fat in four days combining a very low-calorie diet with prolonged exercise, to induce an energy deficit of 5000 Kcal/day. In this study, 15 men with overweight or obesity participated. The volunteers lost 2.1, 2.8, 3.8, and 1.9 kg of fat ($P < 0.05$), after four days of a severe deficit, three days of an isocaloric diet, one month of normal uncontrolled activity and one year later respectively. Approximately 2/3 of this fat loss came from the trunk. These changes in body composition were accompanied by reductions in serum levels of glucose, insulin, HOMA, cortisol, free fatty acids, LDL and total cholesterol, while triglycerides decreased immediately after the phase of high-energy deficit. This study showed that a clinically relevant decrease in body fat could be achieved in four days, accompanied by an improvement in the lipid profile. The second study titled "Exercise preserves lean mass and performance during severe energy deficit: the role of exercise volume and dietary protein content" determined the importance of exercise volume and the ingestion of a small amount of protein in the maintenance of the lean mass during the severe energy deficit associated with this type of intervention. For this, during the severe energy deficit phase, 0.8 g/kg of body weight/day of sugar ($n = 7$) or whey protein ($n = 8$) were administered. Fat-free lean mass decreased by 57 and 29% in the exercised arm (45 min/day) and in the legs (8 h / day), respectively ($P = 0.05$). The lean mass loss was partially recovered after three Days of isocaloric diet. These changes were associated with a slight deterioration in the exercise capacity, which was more pronounced in the protein-consuming group compared to the group that ingested sugar. A linear relationship between changes in lean mass and changes in the cortisol/testosterone index was observed. This study has shown that muscles subjected to a greater volume of exercise during calorie restriction lose less lean mass without isolated protein intake offering any advantage. In the third study, the effects of the intervention on the

muscular leptin signaling system were determined in muscle biopsies obtained from both deltoids and the vastus lateralis of one of the lower limbs. The study showed that leptin muscle receptors and the leptin-signaling cascade are increased in human skeletal muscle during severe energy deficit. This effect is independent of sucrose or whey protein intake. However, protein ingestion partially attenuated the stimulation of the leptin-signaling cascade. Finally in the fourth study titled "Accuracy and precision of the COSMED K5 portable analyzer", it was demonstrated that it is possible to accurately and precisely measure the energy cost during prolonged walks using a portable gas analyzer of the last generation.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de esta tesis ha sido desarrollar un nuevo modelo de ejercicio para la promoción del turismo en Canarias dirigido a la lucha contra la obesidad y fundamentarlo científicamente. El mayor esfuerzo se ha dirigido a demostrar que es posible para seres humanos con sobrepeso someterse a programas de ejercicio de alto volumen pero baja intensidad, de forma segura y consiguiendo efectos beneficiosos para la salud duraderos en el tiempo.

1.2. Turismo Médico y de Salud

El informe Impactur Canarias 2015, realizado por el Gobierno de Canarias y Exceltur, revela que el turismo es responsable del 37.6% del empleo y del 31.9% del PIB (<http://www.gobcan.es/noticias/lanzadera/78308/turismo-eleva-peso-economia-canaria-tras-sumar-13.480-millones-multiplica-empuje-sectores>). No obstante, Canarias sigue siendo una región con un elevado paro por lo que es necesario fomentar nuevas formas de empleo y actividad económicas. El turismo es definido por la Organización Mundial del Turismo (1995) como "las actividades de las personas que viajan y permanecen en lugares fuera de su entorno habitual, por no más de un año consecutivo por ocio, negocios y otros motivos". Conforme a esta definición, el turismo no sólo se limita a los viajes de ocio, si no que también incluye viajar por trabajo, médicos u otros fines. Los viajes relacionados con los servicios de atención sanitaria pueden ser con finalidad terapéutica u orientados al bienestar y el cuidado de la salud. Por lo tanto, el turismo de salud puede definirse como viajar de un lugar de residencia a otro lugar para adquirir los servicios relacionados con la salud. Además de los servicios relacionados con la salud que reciben, turistas de salud pueden beneficiarse de diversas oportunidades turísticas durante sus visitas, por lo que este tipo de actividad puede generar un impacto económico que va mucho más allá del generado por la actividad asistencial dispensada. Esta nueva tendencia en la industria de los cuidados de salud, conocida como "Turismo Médico" o "Turismo de Salud" está ganando popularidad en los países altamente industrializados como EEUU y Europa

(Hanefeld et al. 2014; Lunt and Carrera 2010; Lunt et al. 2016). El aumento de la aceptación de la portabilidad de la asistencia sanitaria en Europa está garantizada por la directiva de la UE sobre la salud transfronteriza (Legido-Quigley et al. 2011), lo cual combinado con el aumento de los costes de los servicios de salud en los países de renta elevada ha generado el contexto socioeconómico ideal para el rápido crecimiento del turismo de salud, que facilita la generación de productos médicos o de salud transfronterizos. Entre los productos más demandados destacan los relacionados con la atención y cuidados dentales, la cirugía bariátrica y la cirugía estética (Hanefeld et al. 2014; Lunt et al. 2016). En el caso de España es paradigmática la demanda de servicios relacionados con la fertilidad, que atrae pacientes no sólo por la competitividad en precios sino también por un gran prestigio en calidad asistencial y resultados (Culley et al. 2011). En el caso de la cirugía bariátrica, cuyo objetivo es disminuir la capacidad digestiva y absorptiva del tubo intestinal, los costes de cada intervención oscilan entre los 6000 y los 12000 Euros dependiendo del país y procedimiento quirúrgico aplicado. Es una técnica que se ha ido haciendo más segura y que tiene un porcentaje de éxito elevado, por lo que se usa cada vez con más frecuencia en los países de renta elevada (Buchwald and Oien 2013; Sjostrom 2013). Con cirugía bariátrica los pacientes obesos pueden conseguir pérdidas de peso sostenidas en el tiempo durante más de 20 años de entre un 15 y un 20% del peso inicial, dependiendo de la técnica empleada (Sjostrom 2013). Puesto que en la actualidad la cirugía bariátrica es vislumbrada como el método más eficaz para reducir el peso corporal de forma duradera, cualquier producto sanitario dirigido a producir adelgazamiento deberá demostrar índices de eficacia similares y también sostenibles en el tiempo para poder competir con la cirugía bariátrica.

1.3. Dieta y ejercicio para inducir pérdida de peso

En realidad, es posible conseguir adelgazamientos importantes con la combinación de regímenes muy severos de ejercicio y dieta hipocalórica, tal y como demostró el estudio de Johannsen y colaboradores (2012). Estos autores determinaron la composición corporal mediante absorciometría fotónica dual en un grupo de 16

varones obesos con índice de masa corporal (IMC) cercano a 50 y los sometieron a un programa severo de ejercicio diarios muy variados, al tiempo que seguía una dieta moderadamente hipocalórica, con motivo de su participación en un show de televisión. Los participantes fueron aislados en un rancho de las afueras de Los Ángeles y cada día realizaban 90 minutos de actividad física vigorosa supervisada consistente en entrenamiento en circuito o ejercicios aeróbicos. Además, eran animados a realizar por su cuenta otras tres horas adicionales de ejercicio diario. Aunque los autores no controlaron la dieta, si recomendaron una ingesta diaria de aproximadamente el 70% de las necesidades estimadas sin incluir el programa de ejercicio. Cada 7-10 días uno de los participantes era expulsado del estudio y dejaba de participar en la parte televisiva, pero siguió el mismo régimen de ejercicio y dieta hasta la finalización del estudio 30 semanas después. A las 30 semanas, los participantes habían perdido un 38% del peso corporal inicial, del que un 17% fue masa libre de grasa y un 83% masa grasa, a pesar que su metabolismo en reposo disminuyó en 244 y 504 Kcal/d a las 6 y 30 semanas, respectivamente (Johannsen et al. 2012). Estos cambios de composición corporal llevaron el IMC desde los valores iniciales de 50 hasta 30 kg/m^2 , gracias a una pérdida de 47 kg de masa grasa (Fig. 1). Como consecuencia de este adelgazamiento y del ejercicio, se produjeron mejoras muy importantes en parámetros clínicos. La glucosa disminuyó de 95 a 76 mg/dl y la insulina disminuyó a la mitad del valor inicial, indicando una mejora importante de la sensibilidad a la insulina. No obstante, el cambio más notorio se produjo en los niveles de leptina, que pasaron de 43 a 2.7 ng/mL, valores estos últimos propios de personas sanas. Igualmente se produjo una mejora (aumento) de los niveles de adiponectina de 2.6 a 4.7 $\mu\text{g/mL}$.

Frente a estos resultados tan espectaculares y alentadores, varios meta-análisis concluyen que los efectos que se pueden conseguir con programas de adelgazamiento basados en dieta y/o ejercicio, a lo sumo pueden aspirar a inducir pérdidas medias de peso próximas a los 4 Kg, tras intervenciones con duraciones comprendidas entre 12 semanas y 12 meses (Shaw et al. 2009). Shaw et al. (2009) analizaron 41 estudios, que incluyeron 3476 sujetos, que siguieron programas de adelgazamiento (dieta y/o ejercicio) con duraciones comprendidas entre 3 y 12 meses. Observaron que la dieta

(sin ejercicio) indujo mayor pérdida de peso (entre 2.8 y 13.6 kg) que el seguimiento de programas basados únicamente en ejercicio (pérdidas de 0.5 a 4.0 Kg). Además, el grupo solo hizo dieta obtuvo mayor beneficio que el grupo que solo hizo ejercicio en reducción de presión arterial sistólica (2.2 mmHg), colesterol total y glucemia basal (0.1 mmol/L). Sin embargo, los mejores resultados los obtuvieron los programas que combinaron dieta y ejercicio, que lograron una pérdida media de peso de 1.1 Kg superior a la observada con otros tratamientos. No obstante, la pérdida media global de los estudios es moderada y se sitúa en la zona de los 4 Kg de peso (Garrow and Summerbell 1995; Shaw et al. 2009).

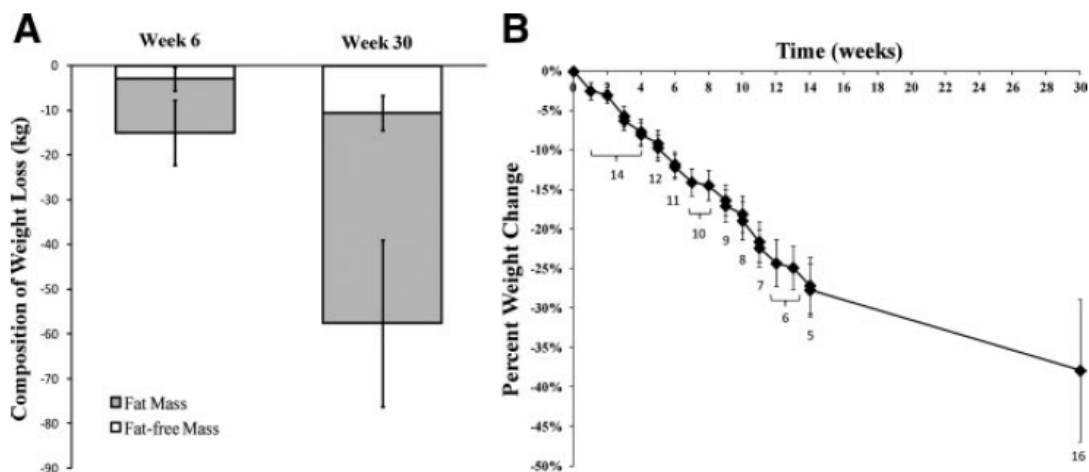


Figura 1. Pérdida de peso en 16 voluntarios con un peso próximo a 150 Kg tras 6 y 30 semanas de restricción calórica moderada combinada con unas 5 horas de ejercicio diario (Johannsen et al. 2012).

Sin embargo otros meta-análisis han comunicado pérdidas medias próximas a los 11 kg de peso (Miller et al. 1997), siendo más eficaz la combinación de dieta más ejercicio que el seguimiento exclusivamente de una dieta, logrando pérdidas medias de peso

tras un año de seguimiento de 6.6 y 8.6 Kg, con solo dieta o la combinación de dieta más ejercicio.

Se pueden conseguir pérdidas similares de peso en solo 3-10 días con programas de ejercicio basados en largas caminatas combinadas con restricción calórica moderada (Carlson and Fröberg 1967; Marniemi et al. 1984; Shpilberg et al. 1990).

1.4. Diseño de un producto turístico dirigido a producir adelgazamiento

El diseño de un producto de adelgazamiento basado en el senderismo vendría a cubrir un vacío en el diseño de productos y servicios turísticos de salud. Muchos turistas obesos o con sobrepeso, que no deseen pasar por una intervención quirúrgica o por un periodo post-operatorio, podrían encontrar en el ejercicio físico moderado y prolongado en un entorno natural y placentero, un servicio eficaz para provocar la pérdida de peso deseada y una mejora metabólica. El producto turístico debería ser capaz de inducir una pérdida de grasa corporal de entre 400-500 gramos diarios, equivalente a una reducción de 4 a 5 kg de grasa corporal en un periodo de 10 días, combinando el ejercicio prolongado con una dieta hiperproteica para evitar la pérdida de masa muscular y disminuir la sensación de hambre (Mittendorfer and Klein 2001). Así mismo debería inducir mejoras sustanciales de salud cardiovascular y metabólica en el plazo de entre una a dos semanas, pero sin utilizar medios quirúrgicos. Debería usar métodos naturales (actividad física y dieta) y tecnologías modernas, rápidas y muy objetivas para cuantificar la pérdida de grasa corporal (absorciometría fotónica dual de rayos X o DXA y resonancia magnética o RM). Por otra parte, este programa podría poner en valor el patrimonio natural de Canarias y contribuiría al desarrollo económico de los pueblos y núcleos de población adyacentes a las rutas y senderos que formarían parte del programa de actividad física, activando la economía de servicios externalizados.

El producto turístico debería basarse en modelo de ejercicio atractivo, que puedan realizar con facilidad la mayoría de las personas. La marcha constituye la forma de locomoción natural del ser humano, que en sus orígenes fue nómada y debió

recorrer grandes distancias en busca de alimento (Ben-Dor et al. 2011). Para producir un déficit medio de 2,000 Kcal diarias es necesario disponer de senderos con un kilometraje suficiente y en condiciones de seguridad que deberían ser investigadas. Para ello es necesario disponer de herramientas que permitan describir el coste energético de las rutas, más allá de la simple estimación usando ecuaciones de predicción del coste energético de la marcha o acelerómetros, cuya validez es limitada.

1.5. Factibilidad del ejercicio prolongado con restricción calórica severa como modelo de ejercicio

La factibilidad de este tipo de esfuerzo ha sido previamente demostrada (Carlson and Fröberg 1967). Carlson y Fröberg (Carlson and Fröberg 1967) evaluaron a 12 hombres que caminaron 500 km en 10 días ingiriendo agua y 200 kcal/día de zumos. El colesterol de baja densidad (LDL) y los triglicéridos se redujeron en un 50 y 43% respectivamente, mientras que el peso corporal se redujo en un 10%. Marniemi et al. (1984) estudiaron a 13 mujeres de mediana edad y 10 hombres (de 21 a 49 años) que recorrieron caminando 344 km durante 7 días. Las distancias recorridas cada día fueron de 57, 53, 67, 53, 41, 36, y 37 km a una velocidad media del 3.5 km/h. Durante la caminata los sujetos bebieron agua, bebidas minerales, zumos y ad libitum. En este estudio los sujetos perdieron un 7% de peso corporal, los triglicéridos y el colesterol total descendieron en un 30-40%, el índice colesterol HDL/colesterol aumentó en un 40% y los ácidos grasos libres en suero subieron de 1.5 a 2 veces sobre el nivel inicial. Estos cambios metabólicos se acompañaron de una respuesta hormonal propia del déficit energético (Cahill 2006; Opstad 2001), caracterizada por un descenso de la glucemia e insulina en suero basal, así como aumento de cortisol y catecolaminas en plasma (Marniemi et al. 1984). La concentración de testosterona en suero disminuyó en los hombres, pero no en las mujeres (Marniemi et al. 1984).

Shpilberg et al. (1990) analizaron los cambios en los lípidos plasmáticos experimentados por 16 varones de 18 a 21 años de edad, en buena condición física ($VO_2\text{max}$ de 59 mL/(kg.min)) que fueron privados de alimento durante 81 h, al tiempo que caminaron 10 horas/d, al 40% de $VO_2\text{max}$, cubriendo un total de 105 km. Los

sujetos perdieron 6.2 Kg de peso corporal y experimentaron descenso en las concentraciones plasmáticas de colesterol LDL y triglicéridos, mientras que el colesterol total, el colesterol HDL y los ácidos grasos libres aumentaron.

Por o tanto, los estudios previos demuestran que los programas de ejercicio basados en largas caminatas son factibles y se asocian a cambios favorables de la masa corporal y cambios favorables en el perfil lipídico. No obstante ninguno de estos tres estudios (Carlson and Fröberg 1967; Marniemi et al. 1984; Shpilberg et al. 1990) fue realizado en personas con sobrepeso u obesidad. Además en los estudios previos no se determinaron los efectos de la composición de la dieta ni se estudiaron en la debida profundidad los efectos sobre la composición corporal. Tampoco se evaluaron los efectos a medio y largo plazo.

1.6. Preservación de la masa magra durante la restricción calórica

Las dietas muy bajas en calorías (VLCD, <3350 kJ / día) son muy eficaces para provocar pérdida de peso, pero tienen un problema y es que tanto el ayuno total como la dieta hipocalórica se asocian a pérdida de masa libre de grasa (FFM) (Chaston et al. 2007; Dulloo et al. 1996), principalmente debido a la activación del catabolismo de las proteínas musculares para sostener la gluconeogénesis hepática (Cahill 2006). En las personas con normopeso, la contribución de la FFM a la pérdida de peso supera a menudo el 35% de pérdida de peso total (Bosy-Westphal et al. 2009; Johnson et al. 1994), mientras que la reganancia de peso promueve más ganancia de masa grasa que de FFM (Bosy-Westphal and Muller 2014). En cambio, en personas con sobrepeso u obesidad la FFM representa entre un 20 y 30% de la pérdida total de peso (Bosy-Westphal and Muller 2014; Magkos et al. 2016; Ross et al. 2000; Santanasto et al. 2011; Weiss et al. 2007). La reganancia de peso después de una dieta comporta una reganancia de FFM (Bosy-Westphal and Muller 2014). Los hombres tienden a perder más FFM que las mujeres, especialmente en las fases iniciales de la pérdida de peso (Millward et al. 2014; Sartorio et al. 2005).

La pérdida excesiva de masa libre de grasa (FFM) puede ser perjudicial, dado que el músculo esquelético representa entre un 15 y un 17% del metabolismo de

reposo (Muller et al., 2002) y es, además, esencial para el mantenimiento de la masa ósea (Aloia et al. 1995; Vicente-Rodriguez et al. 2005) y de la capacidad para realizar ejercicio (Marks and Rippe 1996; Weiss et al. 2007). Weiss et al. (2007) estudiaron a hombres y mujeres sanos de entre 50 y 60 años de edad (con IMC entre 23.5 y 29.9 Kg/m²) antes y después de 12 meses de pérdida de peso inducida por restricción calórica (n = 18) o por ejercicio (n = 16). La pérdida de peso fue de 10.7 y 9.5 % (FFM de 3.5 y 2.2 %). Sin embargo, el volumen de los músculos del muslo medidos por resonancia magnética sólo disminuyó (-7%) en el grupo que sólo hizo dieta mientras que se mantuvo en el grupo que realizó ejercicio. No obstante, la fuerza isométrica máxima de flexión de la rodilla no se modificó de forma significativa en ninguno de los dos grupos, la fuerza dinámica isocinética de flexión empeoró solo en el grupo de dieta, aunque este efecto solo fue estadísticamente significativo al comparar los resultados en porcentajes. Otros estudios han obtenido resultados similares (Ryan and Harduarsingh-Permaul 2014; Santanasto et al. 2011), es decir mantenimiento de la fuerza muscular después de la pérdida de peso o una ligera disminución de la fuerza muscular (Backx et al. 2016; Johnson et al. 1994; Santanasto et al. 2011). Es decir, los datos no son concluyentes y faltan estudios sobre los efectos de la pérdida de masa muscular en la funcionalidad del músculo en personas jóvenes y de mediana edad. El efecto de la pérdida de peso sobre el consumo de oxígeno en músculos sometidos a ejercicio y no ejercitados durante el déficit energético no ha sido estudiada.

El mantenimiento a largo plazo del peso es más exitoso cuanto menor es la pérdida de FFM provocada por la VLCD (Vogels and Westerterp-Plantenga 2007). Por estas razones, existe un gran interés en reducir la pérdida de FFM durante las intervenciones diseñadas para promover adelgazamiento.

Ensayos clínicos controlados con asignación aleatoria de pacientes han demostrado que hacer ejercicio mientras que siguen dietas bajas en calorías (LCD) (unos ~ 4184 kJ/día menos de lo normal) atenúa la pérdida de la FFM (Janssen et al. 2002; Janssen and Ross 1999; Rice et al. 1999). Se desconoce, sin embargo, si este efecto se limita a los músculos que son ejercitados (Weiss et al. 2007) o afecta también

a los músculos que no hacen ejercicio, tal y como han sugerido algunos investigadores (Janssen et al. 2002; Janssen and Ross 1999).

Aunque la FFM puede ser también preservada por el incremento de la proporción entre proteínas y carbohidratos en las dietas de pérdida de peso (Krieger et al. 2006), esto sólo se ha demostrado claramente en intervenciones prolongadas que ocasionaron un déficit energético moderado (Johnston et al. 2004). En cualquier caso, el efecto protector sobre la masa magra de un aumento de la ingestión diaria de proteínas depende de la ingesta total (Pasiakos et al. 2013) y podría estar modulada por la distribución de la ingestión de proteínas a lo largo del día (Cava et al. 2017). Durante las dietas tipo LCD mantenidas durante 2-4 semanas, combinando entrenamiento de fuerza con entrenamiento interválico de alta intensidad, un mayor consumo de proteínas se asocia a mejor preservación de la masa magra y mayor pérdida de masa grasa que la dieta control con menos proteínas (Longland et al. 2016; Mettler et al. 2010).

En contraste con estos resultados, la masa corporal magra se redujo de manera similar en cadetes de infantería que siguieron una dieta de 0.5 g/d de proteína comparada con otra dieta de 0.9 g/d de proteína, durante los ocho días de intervención consistente en restricción calórica combinada con gran volumen de ejercicio diario, causando un déficit energético diario de ~ 9600 kJ. Sin embargo, se desconoce si el ejercicio de baja intensidad puede preservar la masa magra en los seres humanos cuando el déficit de energía es tan elevado como el observado durante las competiciones de triatlón tipo Ironman (Kimber et al. 2002).

1.7. Fundamentación científica de los efectos metabólicos y moleculares del ejercicio prolongado combinado con restricción calórica severa

El entorno natural para la actividad física es de un valor excepcional en Canarias. No obstante, el valor añadido de cualquier producto destinado a inducir adelgazamiento será mayor si sus efectos sobre el peso se demuestran con estudios basados en la evidencia científica. Por ello hemos decidido examinar los efectos que tiene la restricción calórica severa acompañada de ejercicio prolongado no sólo sobre la

composición corporal sino también sobre variables metabólicas de interés clínico, principalmente glucemia, insulina, sensibilidad a la insulina y perfil lipídico, así como hormonas especialmente importantes por su papel en la regulación del apetito y de la oxidación de grasas como la leptina (Considine et al. 1996; Friedman 2016; Mars et al. 2006). Además, para avanzar aún más en el conocimiento de los efectos que produce este tipo de intervención en el músculo esquelético nos hemos planteado un estudio en el que se analicen los principales mecanismos moleculares a través de los cuáles se produce la señalización por leptina en el músculo esquelético humano.

La leptina es una hormona de 16 KDA estructuralmente relacionada con citoquinas (Zhang et al. 1994), principalmente liberada por el tejido adiposo blanco y capaz de actuar sobre receptores cerebrales y periféricos (Considine et al. 1996; Friedman and Halaas 1998; Tartaglia et al. 1995) que pertenecen a la clase I de receptores de citoquinas (Tartaglia 1997). Se han identificado seis isoformas del receptor de leptina (OBR) generadas por corte y ensamblaje alternativo del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y/o el procesamiento proteolítico de las cadenas peptídicas (Lee et al. 1996; Tartaglia 1997). La isoforma larga del receptor de leptina tiene un dominio intracelular altamente conservado en varias especies, que es crítico para los efectos de esta hormona (Tartaglia 1997). El gen que codifica el receptor de leptina se expresa en casi todos los tejidos incluido el músculo esquelético (Friedman 2016; Guerra et al. 2007; Tartaglia 1997).

La concentración de leptina en plasma se eleva en la obesidad (Friedman 2016; Myers et al. 2010; Steinberg et al. 2002). La hiperleptinemia provoca resistencia a la leptina (Knight et al. 2010), la cual se asocia a la regulación decreciente de número de receptores de leptina (OBR) y menor activación de la cascada de señalización en el músculo esquelético de los sujetos obesos (Fuentes et al. 2010). Se desconoce si una reducción de la concentración plasmática de leptina se asocia a una regulación creciente del número de receptores de leptina y aumento la actividad de la cascada de señalización intracelular de la leptina en los músculos esqueléticos de las extremidades superiores e inferiores de los seres humanos.

Cuando la leptina se une a sus receptores en el músculo esquelético (Guerra et al. 2007; Wolsk et al. 2011) provoca la activación de Janus quinasa 2 (JAK2), que se autofosforila en Tyr1007 / 1008 (pJAK2) y, posteriormente, fosforila residuos de tirosina (Tyr) 813,985,1077 y 1138 (Tyr1138 en roedores es equivalente a Tyr1141 en seres humanos) (Tartaglia et al. 1995). La fosforilación de Tyr813 activa la vía de la Akt-fosfatidilinositol-3-quinasa, mientras que la fosforilación en la Tyr985 activa la vía de ERK/MAP-quinasa (Banks et al. 2000; Li et al. 2007). La unión del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) a fosfoTyr1147-OBR es necesaria para la fosforilación y activación de STAT3 en la Tyr705 (pSTAT3) por pJAK2 (Banks et al. 2000). A continuación fosfo-Tyr705-STAT3 forma homodímeros que actúan como factor de transcripción para inducir la expresión génica del programa leptina-dependiente (Banks et al. 2000; Bates et al. 2003). La señalización por leptina es inhibida por dos actores principales: la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) y por el supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3). PTP1B desfosforila y desactiva a pJAK2 (St-Pierre and Tremblay 2012), mientras que SOCS3 inhibe la señalización de la leptina mediante la unión a Tyr985 (Bjørnbæk et al. 2000; Knobelspies et al. 2010) (Fig. 2).

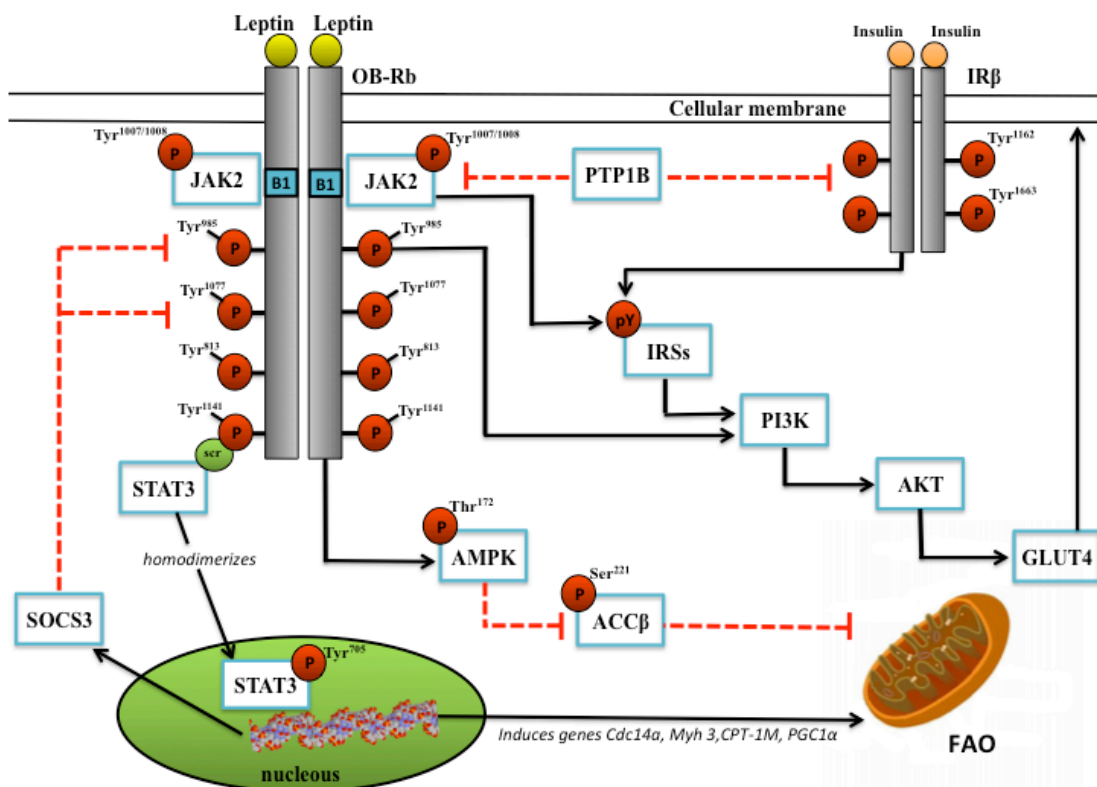


Figura 2. Cascada de señalización por leptina en el músculo esquelético humano

El ejercicio regular se ha asociado con sobre-expresión de OBR en los músculos del brazo (Olmedillas et al. 2010), pero no en los músculos de los muslos (Olmedillas et al. 2011). Por otra parte, el ejercicio de alta intensidad actúa como un mimético de la leptina, activando su cascada de señalización en el vasto lateral (Guerra et al. 2011). En contraste, una semana de reposo en cama eleva la concentración de leptina en suero ligeramente sin aumentar la fosforilación de STAT3 o la expresión OBR, lo que indica un cierto grado de resistencia a la leptina en el músculo esquelético, explicado en parte por el aumento de expresión de la proteína PTP1B en el vasto lateral (Guerra et al. 2014). Sin embargo, aún se desconoce si el ejercicio de baja intensidad en combinación con dieta afecta a la señalización de la leptina y OBR en el músculo esquelético. Curiosamente, el ayuno provoca regulación creciente de número de receptores de leptina y de la señalización a través de JAK2/STAT3 en células de leucemia linfoblástica aguda en ratones, pero no altera la expresión de OBR en células

mieloides y linfoides de ratones sanos (Lu et al. 2017). Se desconoce si el déficit de energía severo ejerce efectos similares en los músculos esqueléticos humanos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es establecer las bases científicas para el desarrollo de un nuevo programa de ejercicio que se pueda utilizar para la promoción del turismo de adelgazamiento en Canarias. Para ello en primer lugar es necesario demostrar que es posible para seres humanos con sobrepeso, someterse a programas de ejercicio de alto volumen pero baja intensidad, de forma segura y consiguiendo efectos beneficiosos para la salud que sean duraderos en el tiempo. Con esta finalidad se han establecido los siguientes cuatro objetivos:

- 1) Caracterizar los efectos del ejercicio prolongado acompañado de restricción calórica a 3.2 Kcal por Kg de peso corporal y por día, para inducir un déficit energético diario de 5000 Kcal sobre la composición corporal en hombres con sobrepeso.
- 2) Determinar los efectos del programa anterior sobre los niveles séricos de lípidos, glucosa, insulina y leptina en los hombres con sobrepeso.
- 3) Determinar la influencia del ejercicio de baja intensidad acompañado o no de la ingestión de 0.8 g de proteína por kg de peso corporal y por día en la preservación de la masa muscular y de la función muscular en varones sanos con sobrepeso.
- 4) Determinar los efectos del déficit energético severo en el sistema de señalización muscular de la leptina.
- 5) Determinar si la inclusión de proteínas a la dosis diaria recomendada influye en la regulación de la cascada de señalización por leptina en el músculo esquelético humano.
- 6) Determinar si el volumen de ejercicio durante el déficit energético severo influye en la regulación de la cascada de señalización por leptina en el músculo esquelético humano.

7) Determinar la validez y fiabilidad de un calorímetro portátil para medir el coste energético de la marcha en rutas de senderismo durante el ejercicio prolongado

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

Esta tesis ha sido diseñada considerando las siguientes hipótesis.

- 1) El ejercicio físico prolongado de alto volumen acompañado de restricción calórica severa es bien tolerado por personas con sobrepeso u obesidad.
- 2) La inclusión de proteínas a la dieta durante el déficit energético severo de corta duración permitirá facilitar la oxidación de grasas y ayudará a preservar parte de la masa magra en personas con sobrepeso u obesidad.
- 3) Una intervención basada en cuatro días de ejercicio y restricción calórica severa que produzca un déficit energético de unas 5000 Kcal/día se acompañará de una pérdida importante de masa grasa y mejoras en el perfil lípido y en la sensibilidad a la insulina.
- 4) El déficit energético severo producirá un descenso de los niveles circulantes de leptina y activará la cascada de señalización por leptina en el músculo esquelético humano para facilitar la oxidación de grasas.
- 5) Es posible determinar de forma válida y fiable el coste energético de la marcha mediante calorimetría indirecta usando analizadores portátiles de gases espirados.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Sujetos

Se reclutaron 15 voluntarios de sexo masculino cuyas características físicas aparecen descritas en la Tabla 1. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a ingerir una dieta consistente únicamente en sacarosa (n = 7) o proteína de suero (n = 8) durante la fase de restricción calórica descrita más adelante. Una población de estudio de este tamaño es adecuada para revelar cualquier diferencia significativa de 1.5 veces mayores que el coeficiente de variación (que se sitúa por debajo del 10% en la mayoría de las variables de composición corporal, de condición física y bioquímicas) entre los valores medios de las variables estudiadas, con un nivel de significación de $P \leq 0.05$ y una potencia estadística de 0.8. Este estudio fue aprobado previamente por la Junta Regional de Revisión Ética de la Universidad de Umeå (Umeå, Suecia), así como por el Comité de Ética de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Todos los participantes dieron su consentimiento por escrito una vez informados de los riesgos y beneficios potenciales de su participación en el estudio.

Tabla 1. Características de los sujetos.

	Dieta			
	Sacarosa (n=7)		Proteínas (n=8)	
Edad (años)	38.7	± 8.2	43.0	± 8.0
Talla (cm)	181	± 5.5	180	± 4.2
Peso (Kg)	98	± 12.0	100	± 14.9
IMC (Kg/m ²)	29.9	± 3.1	30.9	± 4.2
Masa magra (Kg)	63.1	± 3.1	65.4	± 6.0
Masa grasa (Kg)	31.5	± 9.1	31.4	± 9.2
Grasa (%)	31.6	± 5.3	30.9	± 4.1
VO ₂ pico (L/min)	3.8	± 0.3	3.9	± 0.3
Ingesta diaria (Kcal)	2256	± 513	2086	± 489
Actividad física (IPAQ) (Kcal/d)	612	± 315	601	± 289

IPAQ: International Physical Activity Questionnaire; IMC: índice de masa corporal.

4.2. Protocolo experimental

El protocolo experimental incluyó una fase basal (PRE), seguida de cuatro días de restricción calórica y ejercicio (CRE), continuados inmediatamente por 3 días con ejercicio reducido a no más de 10.000 pasos diarios y una dieta isocalórica (CD) con la dieta registrada en la fase PRE (Fig. 3). Durante la fase PRE y al final de las fases CRE y CD, se evaluó la composición corporal (Lunar iDXA, GE Healthcare, Madison, WI, EE.UU.) y el consumo de oxígeno pico (VO_{2pico}) (ver más adelante) y se extrajeron muestras de sangre de 30 ml (en decúbito supino). Las muestras de sangre fueron extraídas por la mañana tras 12 horas de ayuno. Aunque el muestreo de sangre más frecuente habría permitido tener en cuenta los ritmos circadianos, las variaciones diurnas en los niveles de cortisol y testosterona se reducen por un déficit prolongado de energía (Opstad 2001), mejorando la representatividad de una única determinación.

La fase PRE comenzó con dos días sin ejercicio, seguido de un ayuno nocturno de 12 h y extracción de una muestra de sangre de 30 ml temprano en la mañana del tercer día. Se tomó otra muestra basal de sangre siete días más tarde en condiciones similares. Puesto que no se observaron diferencias significativas entre las dos muestras basales, éstas fueron promediadas para obtener un único valor representativo de la fase PRE. Durante los siete días que precedieron a la fase CRE, se pidió a los voluntarios que comieran como de costumbre y registraran su ingesta de alimentos (ver más adelante). Durante los primeros cuatro días que precedieron a la fase CRE, se evaluó la composición corporal, el VO_{2pico} y la potencia (W_{peak}) como se describe con detalle a continuación.

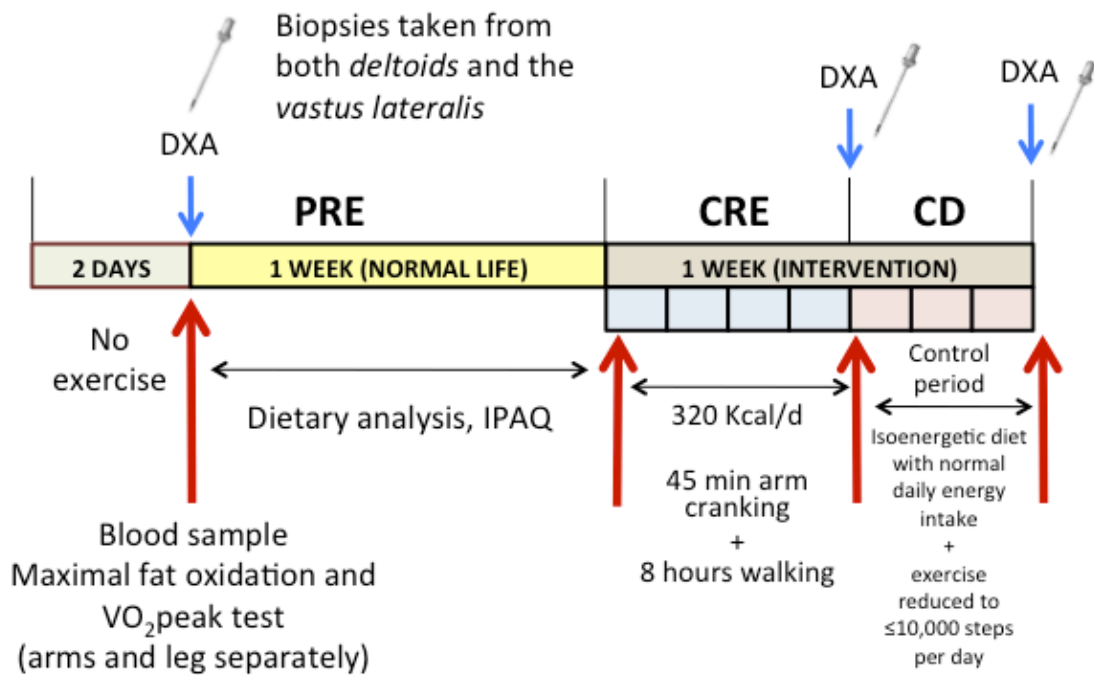


Figura 3. Protocolo experimental

La fase CRE comenzó con una extracción de sangre por la mañana en ayunas tras al menos 12 horas sin ingestión de alimento. Cada uno de los cuatro días que duró la fase CRE, los sujetos realizaron a primera hora de la mañana 45 minutos de pedaleo de un brazo a un 15% de la W_{peak} del ejercicio de pedaleo de brazos unilateral. El brazo con el que se realizó el ejercicio de 45 minutos fue elegido al azar. A continuación, los sujetos caminaron durante ocho horas (a temperaturas ambientales que oscilaron entre 2.9 y 10.2 °C) a lo largo de senderos forestales y carreteras rurales en las inmediaciones del Centro de Investigación Sueco de Deportes de Invierno en Östersund. Cada día los sujetos recorrieron 35 km a 4.5 km/h (RS800CX Heart Rate Monitor equipado con GPS, Polar Oy, Oulu, Finlandia), con cinco minutos de descanso cada hora. De forma doble ciega, ingirieron sacarosa o proteína de suero de leche (0.8 g/kg de peso corporal) (Syntrax Nectar, Syntrax Innovations, Scott City, MO, EE.UU.), ambos disueltos en 1.5 L de agua con minerales. Los sujetos no ingirieron durante la fase PRE ningún otro alimento que las bebidas proporcionadas. La ingestión total de energía fue de 13.4 kJ/kg de peso corporal/día. La solución de proteína de suero

también contenía Na^+ (308 m/l) y K^+ (370 mg/l), así como la solución de sacarosa (160 mg de Na^+ y 100 mg de K^+ por L). Los sujetos bebieron 0.5 L de esta solución por la mañana (justo antes del ejercicio de pedaleo de brazos) y otra vez a mediodía y a las 8 de la tarde. Así, el último alimento se consumió al final de las caminatas, para facilitar la síntesis de proteínas durante la noche en aquellos que ingerían proteína de suero de leche (Snijders et al. 2015). Además, se permitió a ambos grupos beber una solución hipotónica de rehidratación que contenía Na^+ (160 mg / L), Cl^- (200 mg / L), K^+ (100 mg/L), citrato (700 mg / L) y sacarosa 3 g/L) ad libitum. A pesar de la diferencia en la composición de estas bebidas, los grupos de sacarosa y proteína de suero de leche bebieron cantidades similares de solución rehidratante diariamente (3.6 ± 0.9 y 3.3 ± 0.7 L/día ($P=0.51$) o 10.7 ± 2.7 y 9.9 ± 2.2 g/día de sacarosa adicional ($P=0.51$), respectivamente) durante la fase CRE (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de las dietas durante las tres fases de este estudio.

		Dieta	
		Sacarosa (n=7)	Proteína suero (n=8)
PRE	Carbohidratos (g)	211.5 ± 59.4	212.3 ± 59.8
	Grasas (g)	92.0 ± 14.6	80.2 ± 21.7
	Proteínas (g)	99.8 ± 29.6	83.7 ± 18.0
	Fibras (g)	18.7 ± 5.3	17.1 ± 4.5
	Etanol (g)	26.1 ± 17.4	25.7 ± 14.2
	Energía (kJ)	9439 ± 2145	8728 ± 2047
	CRE	Carbohidratos (g)	89.1 ± 11.4
Grasas (g)		0.0	0.0
Proteínas (g)		0.0	80.1 ± 11.9
Fibras (g)		0.0	0.0
Etanol (g)		0.0	0.0
Energía (kJ)		1492 ± 191	1506 ± 215
CD		Carbohidratos (g)	265.7 ± 46.1
	Grasas (g)	90.8 ± 17.2	90.6 ± 11.9
	Proteínas (g)	71.1 ± 14.2	70.7 ± 10.4
	Fibras (g)	36.7 ± 9.3	35.1 ± 5.6
	Etanol (g)	0.0 ±	0.0 ±
	Energía (kJ)	8936 ± 1632	8907 ± 1398

PRE: medidas previas de referencia; CRE: cuatro días de restricción calórica y ejercicio; CD: tres días de dieta control combinado con ejercicio reducido (CD). Los valores presentados son medias ± desviación estándar.

Cada día durante la fase de CD, todos los participantes ingirieron tres comidas normalizadas que contenían su ingesta diaria normal de energía (evaluada al pesar todos los alimentos ingeridos durante 7 días del período previo a la prueba) y no se permitió caminar más de 10,000 pasos. Esta fase fue diseñada para permitir la reposición del agua corporal y la estabilización del peso corporal.

Durante la CRE y el CD, los participantes se acostaron alrededor de las 22.00 h y se despertaron alrededor de las 06.30 h.

4.3. Evaluación de la actividad física, la nutrición y la composición corporal

Se empleó la versión corta del Cuestionario Internacional de Actividad Física para evaluar el gasto energético diario relacionado con la actividad física (Craig et al. 2003; Serrano-Sanchez et al. 2010). Durante los 7 días de la fase PRE los participantes pesaron y registraron todos los alimentos ingeridos (Dietist XP, Kost y Näringsdata, Bromma, Suecia). Durante la fase CD, se les proporcionó una dieta con el mismo contenido energético que el registrado durante la fase PRE. Durante la fase CD, la ingestión real de nutrientes se determinó pesando el plato lleno y de nuevo volviendo a pesar los platos con la comida residual, en caso de existir alguna fracción de alimento no ingerida. La ingesta real de energía durante la fase CD fue también calculada con el mismo software de análisis nutricional (Dietist XP). Durante la fase de PRE, los grupos de sacarosa y de proteína de suero de leche ingirieron $9,439 \pm 2,145$ y $8,728 \pm 2,047$ kJ/d (medias \pm SD), respetivamente. Durante CD, los valores correspondientes fueron $8,936 \pm 1,632$ y $8,907 \pm 1,398$ kJ/d. La ingestión diaria de proteínas en su dieta durante la fase PRE fue de 0.76 y 0.75 g/kg de peso corporal/día en los grupos de sacarosa y proteínas de suero de leche, respetivamente.

La composición corporal se determinó siempre por la mañana, después de 12 horas de ayuno mediante absorciometría dual de rayos X (Calbet et al. 1998). La masa magra (LM) se definió como $LM = \text{Masa total} - \text{la masa de grasa} - \text{contenido mineral óseo}$.

4.4. Medición del pico de consumo de oxígeno

Para medir el consumo de oxígeno y la producción de CO_2 se empleó un metabolímetro Jaeger Oxycon Pro (Viasys Healthcare, Hoechberg, Alemania), calibrado con un 16.0% de O_2 y 4.0% de CO_2 (Air Liquide, Kungsängen, Suecia), a bajo, medio y alto flujo utilizando una jeringa de calibración de 3 L (Hans Rudolph Inc., de Kansas City, MO, EE.UU.), según las recomendaciones del fabricante. Los valores de VO_2 pico se determinaron mediante test incrementales independientes de pedaleo de ambas piernas (ejercicio de cuerpo entero), de pedaleo del brazo dominante y de pedaleo del

brazo no dominante, usando un cicloergómetro convenientemente calibrado (Monark Ergomedic unidad 839E, Monark Ejercicio AB, Vansbro, Suecia). De forma aleatoria, se asignó uno de los brazos a “brazo control” y el otro a “brazo ejercitado”, siendo éste último el que realizaría los 45 min de ejercicio a primera hora de la mañana cada uno de los cuatro días de la fase CRE. Primero se midió el $VO_{2\text{pico}}$ de los brazos y después de las piernas. Los brazos fueron testados en orden aleatorio (Achten et al. 2002; Ponce-Gonzalez et al. 2016). El test incremental de pedaleo de brazos empezó con 10 W durante 5 min, seguido de un aumento de 10 W cada 3 min. La prueba de pedaleo de dos piernas arrancó a 30 W durante 5 min, seguido de incrementos de 30-W cada 3 min. La fase inicial del test incremental con escalones de tres minutos se detuvo al final del escalón de 3-min durante el cual el $RER > 1.0$. Después de 5 min de recuperación, los sujetos realizaron una segunda fase de ejercicio incremental hasta el agotamiento con incrementos de carga de 10 o 30 W cada min, para los protocolos de brazos y piernas, respectivamente, empezando con la carga alcanzada en la fase de incrementos de carga cada 3 min. La primera fase con incrementos de carga cada tres minutos se empleó para medir la capacidad máxima de oxidación de grasas, mientras que la fase siguiente del test incremental con incrementos cada minuto se empleó para determinar el $VO_{2\text{pico}}$. Durante las pruebas, los participantes fueron instruidos para mantener la cadencia de pedaleo a 80 rpm. Entre las pruebas incrementales de brazos y piernas se dejaron al menos 30 minutos de recuperación o el tiempo necesario para que el nivel de lactato en sangre capilar del lóbulo de la oreja alcanzará valores inferiores a 3.0 mmol/L (Biosen C-line, EKF Diagnostics GmbH, Barleben, Alemania). Se tomó como $VO_{2\text{pico}}$ el promedio de 20s más alto observado durante el test incremental.

4.5. Análisis bioquímicos y hormonales

Las muestras de sangre (30 mL) se obtuvieron por la mañana en ayunas entre las 6.30 y las 8.00 h, tras 12 h de ayuno, directamente en Tubos Vacutainer (REF: 368499; 368498). Algunas muestras se recogieron en tubos que contenían EDTA y se centrifugaron durante 5 min a 2000 g y 4 °C, para obtener plasma; mientras que otros

fueron centrifugados durante 10 min a 2000 g y 4 °C para preparar el suero. Todas estas muestras se almacenaron rápidamente a -80 °C hasta su análisis.

La concentración de glucosa en suero se midió con el procedimiento de hexoquinasa, utilizando kits de ABX Pentra (Horiba Medical, Montpellier, Francia). La insulina sérica se cuantificó mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) realizado con kits de reactivos y un analizador automático E170 (Roche Diagnostics SL, Barcelona, España), con una sensibilidad de 0.2 µU/ml y con coeficientes de variación intra e inter-ensayo de 2.0 y 2.6%, respectivamente. El cortisol y la testosterona total se midieron con inmunoensayos enzimáticos de quimioluminiscencia (Immulate 2000 Cortisol, Ref. L2KCO2, Immulate 2000 Total Testosterone, Ref. L2KTW2 y Siemens) que presentaban sensibilidades de 5.5 y 0.5 nmol/L y coeficientes de variación intra e interensayo inferiores al 10%. La testosterona libre se determinó mediante un radioinmunoensayo (Coat-A-Count Free Testosterone, Ref. TKTF1, Siemens) con una sensibilidad de 0.5 pmol/L y coeficientes de variación intra e inter-ensayo menores al 8%. La globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) fue determinada mediante un inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (Immulate SHBG, Ref. L2KSH2, Siemens) con una sensibilidad de 0.02 nmol / L y coeficientes de variación intra e inter-ensayo de 2.7 y 5.2%, respectivamente. El índice de andrógenos libres (FAI) se calculó como $[\text{TT (nmol/L)} / \text{SHBG (nmol/L)}] \times 100$.

La concentración plasmática de aminoácidos se determinó mediante HPLC y detección por fluorescencia, previa derivatización en fase inversa en una columna Resolve C18 de 5 µm (Waters) y posterior detección por fluorescencia. El reactivo de derivatización se preparó disolviendo 50 mg de o-ftalaldehído en 1 ml de metanol y luego añadiendo 9 ml de tampón de borato de potasio (0.4 mol/L, pH 10) y 50 µl de 2-mercaptoetanol. El disolvente A consistía en tampón fosfato (0.1 mol/L, pH 7.0) / metanol / tetrahidrofurano (96: 2: 2) y disolvente B metanol / agua (65:35). El sistema de HPLC contenía dos bombas modelo 510, un módulo de control de bombas PCM, un muestreador automático WISP 710 y un detector de fluorescencia Modelo 470, todos

de Waters (Barcelona, España). Las mediciones se realizaron con una longitud de onda de excitación de 338 nm y longitud de onda de emisión de 425 nm y los datos fueron recogidos y procesados por un sistema computarizado (Modelo 860 Waters Networking Computer System).

4.6. Biopsias musculares, extracción de proteínas totales, transferencia de Western, PCR y composición de la cadena pesada de la miosina

Las biopsias musculares fueron tomadas bajo anestesia local. Después de la desinfección, la piel y el tejido adiposo subcutáneo fueron infiltrados con 1-2 ml de lidocaína al 2%, evitando la inyección de anestesia por debajo de la fascia superficial. Diez minutos más tarde, se hizo una incisión de 6-7 mm y se insertó una aguja de biopsia de tipo Bergstrom 2 cm en el interior del vientre muscular para obtener aproximadamente 100 mg de tejido. La muestra muscular se diseccionó libre de cualquier desecho y tejido adiposo, siendo inmediatamente congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C para su análisis posterior.

Se prepararon extractos de proteína muscular como se ha descrito previamente (Morales-Alamo et al. 2013) y se cuantificó el contenido de proteína total utilizando el ensayo de ácido bicinconínico (Smith et al. 1985). Para ello se homogeneizaron 30 mg de músculo en tampón de lisis de urea (urea 6 M, SDS al 1% y 1X Inhibidor de Proteasa Complete y fosfatasas PhosphoStop 1X) y el lisado se centrifugó durante 15 min a 20.000 rpm a 4 °C. El sobrenadante resultante se diluyó con tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS al 2.3%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol) y se cargaron 35 μ g de proteína en cada carril del gel. Las 9 muestras de cada sujeto y 4 muestras de control (preparadas a partir de músculo esquelético humano sano) se cargaron en el mismo gel, es decir, las cuatro muestras de control siempre tuvieron la misma composición. Las bandas de proteína se normalizaron al valor medio de las densidades de banda de control para tener en cuenta la variabilidad entre geles (Bass et al. 2017). Las proteínas se marcaron con los anticuerpos específicos diluidos en albúmina de suero bovino al 4% en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 al 0.1% (TBS-T) (tampón bloqueante

de BSA). Las bandas de proteína se revelaron mediante incubación con un anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP (diluido a 1:20000 en tampón de bloqueo Blotto) y se visualizaron usando Immuno Western CTM-Star™ (Bio-Rad Laboratories (Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK) ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) Finalmente, se cuantificaron las bandas con el analizador de imágenes Quantity One © (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) Para controlar posibles diferencias en la carga y transferencia, las membranas se tiñeron posteriormente con Reactive Brown 10 y las bandas cuantificadas con el ChemiDoc XRS. Puesto que la carga era homogénea en todas las membranas, no se realizaron más correcciones (ver Western Blots representativos en la Figura 9).

Los niveles de ARNm de *OBR* en las biopsias musculares se determinaron por PCR en tiempo real. Se aisló ARN total utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) y su concentración se midió con espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE). Todas las mediciones de ARNs tenían una relación A260/A280 nm de 2.0 ± 0.2 . Se utilizó una alícuota de cada muestra de ARN para determinar el índice RQI (Experion, Bio-Rad Laboratories), que estuvo comprendido entre 5 y 8. Para la síntesis de cDNA, se transcribieron inversamente 100 ng de ARN total usando una mezcla de oligodT y cebadores de hexámeros al azar (Transcriptor, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los niveles de transcripción del gen *OBR* se cuantificaron mediante PCR en tiempo real (Light Cycler 480, Roche Diagnostics) utilizando cebadores y sondas Taqman diseñadas con el sistema de ensayo UPL (Roche Diagnostics). Cada cDNA se amplificó usando LC 480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics) bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de 10 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 15 s a 72 °C. Todos los resultados se normalizaron a los niveles de dos transcripciones housekeeping (*CYCLOPHILIN* y *GAPDH*), y la cuantificación relativa se calculó por el método de Livak con un "All-to-mean" análisis, incluyendo normalización inter-ensayo (calibrador). Todas las muestras se analizaron en duplicado, se calcularon los valores medios y los resultados fueron expresados como valores relativos sobre el calibrador.

La composición de la cadena pesada de miosina (MHC) se determinó tal y como se ha descrito con anterioridad (Guadalupe-Grau et al. 2016).

4.7. Materiales y anticuerpos

El cóctel de inhibidores de la proteasa completa y el cóctel inhibidor de las fosfatasas PhosSTOP se obtuvieron de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania; # 04693116001 y # 04906845001, respectivamente). El anticuerpo anti-conejo secundario conjugado con HRP fue de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EUA; # 111-035-144 y # 715-035-150, respectivamente). Las membranas de nitrocelulosa Immun-Blot™ y Immun-Star™ Western™ fueron de Bio-Rad Laboratories (Hemel Hempstead Hertfordshire, Reino Unido). El sistema ChemiDoc XRS y el software de análisis de imágenes Quantity One © se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories. Los números de catálogo correspondientes de los anticuerpos de Cell Signaling fueron los siguientes: anti-fosfo-STAT3 (Tyr705), no. 9145; Anti-STAT3 no. 9139; Anti - fosfo - JAK2 (Tyr1007/1008), no. 3771; Anti JAK2, no. 3229. Los anticuerpos anti-SCOS3, no sc-9023; Anti-Tyr1141-OBR, no. Sc - 16420; Anti-Tyr985-OBR, no. sc-16419 se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-PTP1B se obtuvo de Calbiochem (Darmstadt, Alemania, # FG6-1G). El anticuerpo policlonal de receptor de leptina anti-humano de conejo se obtuvo de Linco Research (St. Charles, Missouri, EE.UU., nº 4781-L). El anticuerpo anti- α -tubulina (nº T 5168) se obtuvo de Biosigma (Madrid, España; # T5168).

Los cebadores y las sondas UPL utilizadas para PCR fueron:

OBR (NM_002303.5 *) = Forward (5'CCTGGGCACAAGGACTTAAT3') y Reverse (5'TGTCAGTATGCTGTATGCTTG3'). UPL # 129

CYCLOPHILIN (NM_000942.4) = Forward (5'TGTGGTGTGGCAAAGTTC3') y Reverse (5'GTTTATCCCGCTGTCTGTC). UPL # 10

GAPDH gen (NM_002046.3) = Forward (5'AGCCACATCGCTCAGACAG3') y Reverse (5'GCCAATACGACCAATCC3'). UPL # 60.

4.8. Material y métodos empleados para establecer la confiabilidad y validez del analizador portátil de gases COSMED K5

Catorce sujetos físicamente activos de raza caucásica (3 mujeres y 11 hombres), entre 20 y 43 años, se ofrecieron voluntariamente para participar en el estudio (Tabla 8). Todos los voluntarios proporcionaron su consentimiento por escrito después de ser informados sobre los riesgos y beneficios del estudio.

Tabla 8. Características descriptivas de los sujetos.

Variable (n=14)	Medias \pm SD	Rango
Edad (años)	25.35 \pm 6.48	20.87 - 43.13
Talla (cm)	174.24 \pm 7.56	163.80 - 188.30
Masa corporal (kg)	70.56 \pm 10.55	55.90 - 89.30
IMC (kg/m ²)	23.13 \pm 2.20	19.69 - 27.23
Masa magra (kg)	52.14 \pm 8.88	35.73 - 62.64
Masa grasa (kg)	15.28 \pm 5.50	8.68 - 26.90
Porcentaje grasa (%)	22.67 \pm 7.08	12.30 - 37.30

Valores son medias \pm desviación estándar (SD). IMC, índice de masa corporal.

Composición corporal y calorimetría indirecta

La composición corporal se midió usando absorciometría fotónica dual de rayos X (Lunar iDXA, GE Healthcare, Wisconsin, EE.UU.). La validez del COSMED K5 se determinó por comparación con el Vyntus (CareFusion, Alemania), midiendo la tasa metabólica en reposo (RMR) después de un ayuno de 12 horas. Para este propósito los sujetos llegaron temprano al laboratorio y fueron instrumentados con la mascarilla de Vyntus o COSMED, en orden aleatorio. Después descansaron confortablemente en posición supina durante los siguientes 60 min. Los valores ergospirométricos registrados entre el vigésimo y el minuto 30 se promediaron y se utilizaron como la medida obtenida por el primer metabolímetro conectado. Luego durante los cinco minutos siguientes el dispositivo se cambió al calorímetro alternativo y después de cinco minutos, los datos obtenidos durante un intervalo de otros 10 minutos se promediaron y asignaron al segundo metabolímetro. Para la validación, el Vyntus fue

operado en modo respiración a respiración y el COSMED K5 en modo cámara de mezclas.

La confiabilidad del COSMED K5 se estableció midiendo el gasto de energía durante caminatas prolongadas (13 km), que se repitieron dos veces, dejando al menos 4 días entre pruebas. Se empleó una ruta urbana de interés turístico que recorre la playa urbana de la ciudad de Las Palmas de Gran Canaria (Playa de las Canteras). Esta ruta es relativamente plana e incluye secciones de baldosa y secciones de camino de tierra. Durante las caminatas la velocidad de marcha se mantuvo cerca de 5 km/h, utilizando un Garmin Forerunner 210 equipado con GPS.

Antes de las mediciones, ambos aparatos fueron calibrados con gases de calibración de alto grado suministrados por los fabricantes. Los flujímetros fueron calibrados bombeando aire con una jeringuilla de calibración de 3 L, conforme a las recomendaciones de los fabricantes. Durante la marcha, la frecuencia cardíaca se midió con un sensor Garmin conectado al K5.

Todos los sujetos fueron pesados inmediatamente antes y después de caminar (SECA 869) con todo el equipo y ropa. La balanza fue calibrada, a su vez, con masas de calibración de clase M1 (Scheck, Alemania).

Análisis estadístico

Se verificaron la distribución normal de los valores usando la prueba de Shapiro-Wilks. Los variables sin distribución normal fueron normalizadas mediante transformación logarítmica. Se utilizó una ANOVA de medidas repetidas con el tiempo y las dos dietas (sacarosa versus proteína de suero) como factores intrasujetos para el análisis de los aminoácidos y las respuestas de las medias hormonales. El mRNA de OBR y las densidades de las bandas de proteínas fueron analizadas utilizando ANOVA de medidas repetidas con el tiempo, las dos dietas (sacarosa versus proteína de suero) y las tres extremidades (brazo control, brazo entrenado y piernas) como factores intrasujetos. La prueba de Mauchly de la esfericidad se llevó a cabo antes de la ANOVA y en el caso de violación de la hipótesis de esfericidad, los grados de libertad se

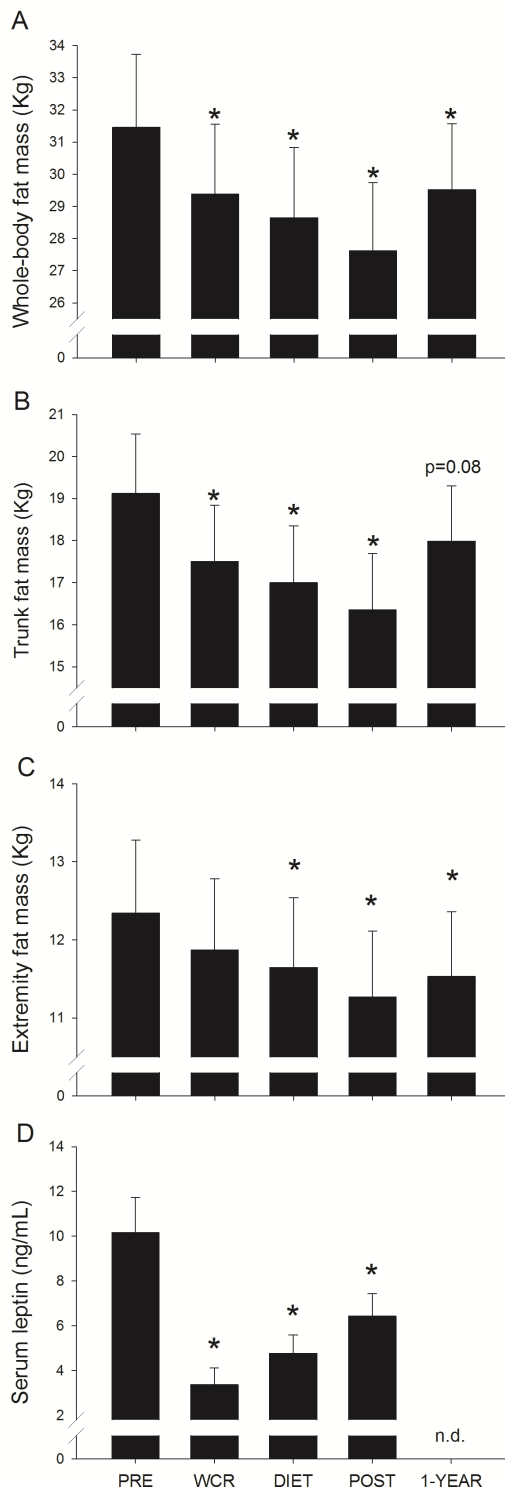
ajustaron según la prueba de Huynh y Feldt. Cuando se observó un efecto principal o interacción significativos, las comparaciones por pares en momentos específicos se ajustaron para comparaciones múltiples con el procedimiento de Holm-Bonferroni. La relación entre las variables se examinó por regresión lineal simple o múltiple. Los valores reflejados son medias \pm desviaciones estándar, excepto que se especifique de otra manera. Para determinar la validez y fiabilidad de analizador de gases portátil K5, se emplearon las técnicas de Bland y Altman, se determinó el coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de concordancia (CCC). Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con una probabilidad de ser debidos al azar inferior o igual al 5% ($P \leq 0.05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS v.15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Composición corporal

Tras 4 días de restricción calórica en combinación con ejercicio, la masa corporal total en ambos grupos se redujo en un promedio de 4.9 kg, siendo 3.9 menor al valor inicial



después de CD (Calbet et al. 2015). La evolución de la composición corporal en los controles realizados tras cuatro semanas y un años después de la intervención están reflejados en la Figura 4.

La masa grasa del cuerpo entero (datos DXA) se redujo en 2.1 y 2.8 kg después de la fase CRE y CD, con cambios similares en el porcentaje de grasa corporal. La masa magra del cuerpo entero se redujo en 2.8 y 1.0 después de CRE y CD, respectivamente. Durante CRE el balance energético obtenidos a partir de los cambios de composición corporal fue de -5535 ± 2083 Kcal/d, $P = 0.24$ (Calbet et al. 2015) (Tablas 3 y 4)

La masa de grasa del tronco se redujo en 1.6 y 2.1 kg después de CRE y CD, respectivamente.

Figura 4. Evolución de la composición corporal y de la leptina sérica

La masa corporal magra se redujo de 64.3 ± 4.9 en PRE a 61.5 ± 4.7 y 63.3 ± 4.5 Kg CRE y CD, respectivamente. La pérdida de masa magra después de CRE fue similar en ambos grupos (tiempo x interacción dieta $P=0.34$), pero fue mayor para los brazos ($\sim -6\%$) que para las piernas ($\sim -4\%$) (tiempo x interacción extremidad $P<0.05$). A pesar de un ligero balance energético negativo durante los tres días de la dieta de control, aproximadamente el 50% de la masa magra perdida de las cuatro extremidades se recuperó como resultado del restablecimiento de las reservas de agua (Calbet et al. 2015). Sin embargo, en comparación con PRE, la reducción de la masa magra en CD fue significativamente mayor para el brazo control ($-3.9 \pm 2.8\%$) que para el brazo entrenado ($-2.8 \pm 2.4\%$, $P = 0,05$) y las piernas ($1.6 \pm 2.0\%$).

5.2. Pico de potencia (W_{peak}) y consumo pico de O_2 (VO_{2pico}) durante el pedaleo

La potencia de pico (W_{peak}) y el VO_{2pico} durante la fase CRE fueron un 15 y 12% menores que los correspondientes valores de PRE (300 ± 23 versus 254 ± 25 W y 8.4 ± 0.33 versus 3.37 ± 0.43 L/min). Después de los 3 días en una dieta de control, el rendimiento fue mejorado; sin embargo, la W_{peak} se mantuvo un 4.7% por debajo del valor PRE (286 ± 25 W) y el VO_{2pico} todavía era un 5.5% inferior (3.63 ± 0.43 L/min). Estas reducciones se debieron en parte a la pérdida de masa magra. De PRE a CRE, el W_{peak} (W/kg LM) y el VO_{2pico} (mL/(kg LM.min)) para las piernas cayeron un 12.2 y 12.3%, respectivamente. La reducción de W_{peak} por Kg de LM de PRE a CRE fue más pronunciada en el grupo que tomó proteínas durante CRE, así como la reducción en VO_{2pico} . Después de 3 días en la dieta de control, los valores de W_{peak} absoluto y VO_{2pico} para el grupo de sacarosa fueron los mismos que los de PRE, pero permanecieron reducidos en un 6.3 y 11.3%, respectivamente, en el grupo de proteína de suero de leche. En términos relativos, el VO_{2pico} se había recuperado completamente en el grupo de sacarosa, pero permaneció reducido en un 11.0% en el grupo que tomó proteínas durante CRE.

Tabla 3. Composición de cuerpo total (WB) y tronco (medias \pm SD) medida por DXA durante las distintas fases experimentales en los sujetos sometidos a restricción calórica y dieta de sacarosa o de proteína de suero de leche en combinación con ejercicio

Variable	Dieta durante restricción calórica	Pre-test (fase I)	Ejercicio + restricción calórica (fase II)	Dieta normal + Ejercicio limitado (fase III)	4 semanas después (fase IV)	Un año después (fase V)	Efecto tiempo	Interacción Tiempo x Suplementación P (Potencia)
Masa WB (Kg)	Sacarosa	98.0 \pm 12.0	93.7 \pm 11.8	94.5 \pm 11.7	93.9 \pm 11.7	97.2 \pm 13.1	a,b,c,d	0.27 (0.22)
	Proteína suero	100.1 \pm 14.9	94.7 \pm 14.2	96.0 \pm 14.2	95.5 \pm 13.4	96.4 \pm 14.3		
Masa magra WB (Kg)	Sacarosa	63.1 \pm 3.1	60.7 \pm 3.0	62.5 \pm 2.8	63.2 \pm 2.7	62.9 \pm 2.8	a,b	0.59 (0.21)
	Proteína suero	65.4 \pm 6.0	62.2 \pm 6.0	64.0 \pm 5.8	64.4 \pm 5.7	64.8 \pm 5.2		
Masa grasa WB (Kg)	Sacarosa	31.5 \pm 9.1	29.6 \pm 8.9	28.7 \pm 8.8	27.4 \pm 9.0	30.9 \pm 10.3	a,b,c,d	0.18 (0.29)
	Proteína suero	31.4 \pm 9.2	29.2 \pm 8.6	28.6 \pm 8.8	27.8 \pm 8.1	28.3 \pm 9.2		
Grasa WB (%)	Sacarosa	31.6 \pm 5.3	31.0 \pm 5.6	29.8 \pm 5.7	28.5 \pm 6.0	31.1 \pm 6.5	a,b,c	0.21 (0.26)
	Proteína suero	30.9 \pm 4.1	30.3 \pm 4.3	29.3 \pm 4.4	28.7 \pm 4.1	28.7 \pm 5.1		
Masa tronco (Kg)	Sacarosa	48.7 \pm 7.1	46.0 \pm 6.4	46.3 \pm 6.7	45.9 \pm 6.6	48.0 \pm 7.8	a,b,c	0.65 (0.07)
	Proteína suero	50.1 \pm 7.9	46.7 \pm 7.6	47.6 \pm 7.3	47.5 \pm 7.4	48.5 \pm 8.1		
Masa magra tronco (Kg)	Sacarosa	28.8 \pm 1.8	27.5 \pm 1.4	28.6 \pm 1.5	29.0 \pm 1.4	28.4 \pm 1.3	a	0.08 (0.61)
	Proteína suero	29.9 \pm 2.5	28.2 \pm 2.8	29.4 \pm 2.4	29.8 \pm 2.7	30.1 \pm 2.2		
Masa grasa tronco (Kg)	Sacarosa	19.0 \pm 5.6	17.5 \pm 5.4	16.8 \pm 5.5	16.0 \pm 5.6	18.6 \pm 6.7	a,b,c	0.22 (0.25)
	Proteína suero	19.3 \pm 5.7	17.5 \pm 5.3	17.2 \pm 5.4	16.7 \pm 5.2	17.5 \pm 6.2		
Grasa tronco (%)	Sacarosa	38.2 \pm 6.0	37.2 \pm 6.7	35.4 \pm 7.0	33.9 \pm 7.5	37.7 \pm 7.8	a,b,c	0.20 (0.28)
	Proteína suero	37.9 \pm 4.8	37.0 \pm 5.0	35.5 \pm 5.3	34.6 \pm 4.8	35.1 \pm 6.7		
Masa grasa androide (Kg)	Sacarosa	3.37 \pm 1.22	3.02 \pm 1.14	2.91 \pm 1.12	2.74 \pm 1.15	3.29 \pm 1.41	a,b,c	0.28 (0.22)
	Proteína suero	3.51 \pm 1.27	3.16 \pm 1.14	3.10 \pm 1.13	2.95 \pm 1.07	3.13 \pm 1.31		
Grasa androide (%)	Sacarosa	42.4 \pm 6.9	41.3 \pm 8.1	39.1 \pm 8.2	37.1 \pm 8.8	41.5 \pm 9.2	b,c	0.18 (0.30)
	Proteína suero	41.9 \pm 5.4	41.1 \pm 5.7	39.7 \pm 6.0	38.1 \pm 5.8	38.3 \pm 8.2		
Masa grasa ginoide (Kg) §	Sacarosa	4.67 \pm 1.58	4.42 \pm 1.53	4.21 \pm 1.52	4.01 \pm 1.49	4.55 \pm 1.69	a,b,c,d	0.16 (0.34)
	Proteína suero	4.28 \pm 1.44	3.92 \pm 1.36	3.83 \pm 1.36	3.73 \pm 1.24	3.79 \pm 1.33		
Grasa ginoide (%)	Sacarosa	29.8 \pm 5.4	29.6 \pm 5.4	28.1 \pm 5.8	26.9 \pm 5.8	29.1 \pm 6.2	a,b,c,d	0.08 (0.50)
	Proteína suero	26.7 \pm 5.2	26.0 \pm 5.5	25.2 \pm 5.4	24.7 \pm 5.1	24.5 \pm 5.2		
Grasa tronco /grasa WB (%)	Sacarosa	60.1 \pm 3.4	58.9 \pm 3.8	58.1 \pm 3.6	57.9 \pm 3.8	59.9 \pm 4.1	a,b,c	0.51 (0.25)
	Proteína suero	61.4 \pm 3.6	60.2 \pm 3.3	60.2 \pm 3.3	59.9 \pm 3.4	61.2 \pm 4.3		

a: $P < 0.05$ para fase I versus fase II; b: $P < 0.05$ para fase I versus fase III; c: $P < 0.05$ para fase I versus fase IV; and d: $P < 0.05$ para fase I versus fase V.

WB: cuerpo total; § log-transformado

Tabla 4. Composición de brazos y piernas (medias \pm SD) medida por DXA durante las distintas fases experimentales en los sujetos sometidos a restricción calórica y dieta de sacarosa o de proteína de suero de leche en combinación con ejercicio.

Variables	Dieta durante restricción calórica	Pre-test (fase I)	Ejercicio + restricción calórica (fase II)	Dieta normal + ejercicio limitado (fase III)	4 semanas después (fase IV)	Un año después (fase V)	Efecto tiempo	Interacción Tiempo x Suplementación P (Potencia)
Masa piernas (Kg)	Sacarosa	32.8 \pm 4.0	31.6 \pm 4.5	32.0 \pm 4.0	31.8 \pm 4.2	32.8 \pm 4.3	a,b,c	0.14 (0.39)
	Proteína suero	32.8 \pm 5.0	31.6 \pm 4.7	31.8 \pm 4.9	31.7 \pm 4.3	31.7 \pm 4.7		
Masa magra piernas (Kg) §	Sacarosa	22.6 \pm 1.4	21.8 \pm 1.7	22.3 \pm 1.3	22.5 \pm 1.6	22.8 \pm 1.4	a,b	0.25 (0.40)
	Proteína suero	23.4 \pm 2.7	22.5 \pm 2.6	22.9 \pm 2.6	22.8 \pm 2.3	23.0 \pm 2.4		
Masa grasa piernas (Kg) §	Sacarosa	8.85 \pm 2.95	8.48 \pm 2.98	8.35 \pm 2.79	7.95 \pm 2.84	8.67 \pm 3.12	a,b,c,d	0.20 (0.27)
	Proteína suero	8.10 \pm 2.54	7.71 \pm 2.45	7.58 \pm 2.43	7.45 \pm 2.22	7.31 \pm 2.42		
Grasa piernas (%)	Sacarosa	26.4 \pm 5.8	26.2 \pm 5.7	25.5 \pm 5.6	24.4 \pm 5.8	25.7 \pm 6.1	b,c	0.19 (0.29)
	Proteína suero	24.2 \pm 4.3	23.9 \pm 4.5	23.3 \pm 4.2	23.1 \pm 4.0	22.6 \pm 4.2		
Masa brazos (Kg) §	Sacarosa	11.4 \pm 1.0	11.0 \pm 1.1	11.1 \pm 1.0	11.1 \pm 1.1	11.4 \pm 1.1	a,b,c,d	0.11 (0.44)
	Proteína suero	12.0 \pm 2.2	11.3 \pm 2.1	11.4 \pm 2.1	11.3 \pm 1.8	11.2 \pm 1.8		
Masa magra brazos (Kg)	Sacarosa	8.2 \pm 0.3	7.8 \pm 0.4	8.0 \pm 0.5	8.1 \pm 0.4	8.2 \pm 0.4	a,b,c,d	0.22 (0.43)
	Proteína suero	8.5 \pm 1.0	7.9 \pm 1.0	8.1 \pm 0.9	8.1 \pm 0.9	8.2 \pm 0.9		
Masa grasa brazos (Kg)	Sacarosa	2.71 \pm 0.77	2.68 \pm 0.77	2.59 \pm 0.73	2.51 \pm 0.77	2.67 \pm 0.87	a,b,c,d	0.15 (0.33)
	Proteína suero	3.03 \pm 1.26	2.92 \pm 1.22	2.82 \pm 1.26	2.67 \pm 0.99	2.58 \pm 0.97		
Grasa brazos (%)	Sacarosa	23.4 \pm 4.8	24.1 \pm 4.6	23.1 \pm 4.6	22.3 \pm 4.9	23.1 \pm 5.6	a,b,c	0.26 (0.22)
	Proteína suero	24.5 \pm 5.3	25.1 \pm 5.4	23.9 \pm 5.7	23.1 \pm 4.8	22.3 \pm 4.8		

a: $P < 0.05$ para fase I versus fase II; b: $P < 0.05$ para fase I versus fase III; c : $P < 0.05$ para fase I versus fase IV; and d: $P < 0.05$ para fase I versus fase V. § log-transformado

5.3. Pico de potencia (W_{peak}) y consumo pico de O_2 (VO_{2pico}) durante el ejercicio de pedaleo de brazos

El entrenamiento aumentó tanto el W_{peak} absoluto como relativo del brazo ejercitado, pero no del brazo de control, mientras que la alteración insignificante del VO_{2pico} del brazo ejercitado podría explicarse por el cambio en la masa magra. De PRE a CRE, el VO_{2pico} absoluto del brazo de control disminuyó 14%, debido principalmente a una reducción del 21% en el grupo de proteínas, un efecto que podría ser sólo parcialmente explicado por la reducción de la masa magra. Después de 3 días en la dieta de control, el VO_{2pico} del brazo de control fue de nuevo similar al valor de PRE, o incluso mayor para el grupo de sacarosa cuando se tuvo en consideración la reducción de la masa magra.

5.4. Cambios metabólicos y hormonales

Como se documenta en la Tabla 5, aunque los niveles plasmáticos totales de los aminoácidos examinados no se alteraron significativamente, el ejercicio y la dieta afectaron los niveles de ciertos aminoácidos individuales. Los niveles de alanina y triptófano se redujeron después de CRE y CD, en la misma medida en ambos grupos. Las concentraciones de asparagina, isoleucina, leucina y valina fueron mayores después de CRE, al igual que los niveles combinados de los tres aminoácidos BCAA (aminoácidos de cadena ramificada) y los aminoácidos esenciales (más glutamina), siendo estos últimos más pronunciados en el grupo de tomó proteínas durante CRE. Después de CRE, la proporción de triptófano en el plasma se redujo en un grado similar en los grupos de sacarosa y proteína.

Los niveles plasmáticos de insulina y testosterona libre y la FAI se redujeron, mientras que SHBG, cortisol y el índice catabólico (cortisol/testosterona total y cortisol/testosterona libre) fueron mayores después de CRE y CD (ver Tabla 5). Aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos después de CRE, el índice C/FT tendió a ser mayor en el grupo que tomó proteínas durante CRE.

Tabla 5. Variables bioquímicas y hormonales (medias \pm SD) de los participantes sometidos a restricción calórica en forma de una dieta de sacarosa o proteínas en combinación con ejercicio seguido de varias fases experimentales

Variables	Dieta durante restricción calórica	Pre-test (fase I)	Ejercicio + restricción calórica (fase II)	Dieta normal + Ejercicio limitado (fase III)	4 semanas después (fase IV)	Efecto tiempo	Interacción Tiempo x Suplementación P (Potencia)
Glucosa (mmol/L)	Sacarosa	5.8 \pm 0.4	4.9 \pm 0.83	5.2 \pm 0.47	5.9 \pm 0.5	a,b	0.10 (0.42)
	Proteína suero	5.4 \pm 0.4	4.6 \pm 0.36	5.4 \pm 0.26	5.3 \pm 0.4		
FFA (mmol/L)	Sacarosa	0.51 \pm 0.08	1.22 \pm 0.37	0.52 \pm 0.09	0.45 \pm 0.12	a	0.20 (0.29)
	Proteína suero	0.45 \pm 0.11	1.52 \pm 0.50	0.59 \pm 0.12	0.43 \pm 0.14		
TG mg/dL §	Sacarosa	127 \pm 23	70 \pm 13	88 \pm 12	110 \pm 39	a,b	0.80 (0.08)
	Proteína suero	199 \pm 89	108 \pm 58	130 \pm 33	198 \pm 132		
Colesterol (mg/dL)	Sacarosa	224 \pm 43	201 \pm 52	179 \pm 35	204 \pm 46	b,c	0.32 (0.30)
	Proteína suero	226 \pm 43	225 \pm 61	195 \pm 46	220 \pm 50		
HDL (mg/dL)	Sacarosa	43 \pm 6	50 \pm 7	38 \pm 7	42 \pm 7	a	0.25 (0.35)
	Proteína suero	37 \pm 10	50 \pm 12	38 \pm 9	38 \pm 10		
Colesterol/HDL	Sacarosa	5.3 \pm 1.3	4.1 \pm 1.2	4.8 \pm 1.2	5.0 \pm 1.2	a,b	0.85 (0.07)
	Proteína suero	6.3 \pm 1.8	4.7 \pm 1.5	5.4 \pm 1.6	6.0 \pm 1.8		
LDL (mg/dL)	Sacarosa	155 \pm 42	137 \pm 50	124 \pm 33	140 \pm 41	b,c	0.33 (0.20)
	Proteína suero	149 \pm 29	153 \pm 56	131 \pm 41	142 \pm 33		
Insulina (mUI/L) §	Sacarosa	8.5 \pm 3.3	4.9 \pm 1.8	6.7 \pm 1.7	8.8 \pm 2.1	a,b	0.92 (0.08)
	Proteína suero	12.1 \pm 9.9	5.8 \pm 2.3	7.4 \pm 3.8	13.0 \pm 10.6		
HOMA §	Sacarosa	2.2 \pm 0.9	1.1 \pm 0.5	1.5 \pm 0.4	2.3 \pm 0.7	a,b	0.99 (0.05)
	Proteína suero	3.0 \pm 2.7	1.2 \pm 0.5	1.8 \pm 1.0	3.1 \pm 2.7		
Leptina (ng/mL) §	Sacarosa	10.5 \pm 5.5	3.7 \pm 2.7	5.2 \pm 3.1	6.7 \pm 3.8	a,b,c	0.39 (0.26)
	Proteína suero	8.9 \pm 6.0	3.1 \pm 3.2	4.4 \pm 3.4	6.2 \pm 4.2		
Cortisol (μ g/dL)	Sacarosa	22.3 \pm 3.5	24.9 \pm 3.9	23.9 \pm 3.2	20.1 \pm 2.8	a	0.23 (0.36)
	Proteína suero	24.7 \pm 3.1	29.4 \pm 7.6	23.3 \pm 4.4	23.0 \pm 3.6		

a: $P < 0.05$ para fase I versus fase II; b: $P < 0.05$ para fase I versus fase III; and c : $P < 0.05$ para fase I versus fase IV. FFA: ácidos grasos libres;

TG: triglicéridos; HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad; LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; HOMA: Modelo homeostático de resistencia a la insulina; § log-transformado

Los cambios en la masa magra de todo el cuerpo entre PRE y CRE correlacionaron con los niveles de testosterona total y libre, el FAI y la relación C/FT ($r = 0.65, 0.61, 0.57, -0.58$, respectivamente). La correlación entre el cambio en la masa magra y el índice C/FT se debió principalmente a la estrecha asociación observada entre estos dos en el grupo de proteína de suero de leche ($r=-0.82, n = 8$). El cambio en el índice C/FT también estuvo asociado al cambio en la concentración de insulina ($r=0.56$). El análisis de regresión múltiple mostró que sólo el índice C/FT podía predecir el cambio en la masa magra, mientras que los cambios en la insulina fueron excluidos del modelo.

Por otra parte, hubo una relación lineal entre la diferencia de masa magra de todo el cuerpo entre PRE y CRE y las correspondientes diferencias en los niveles plasmáticos de isoleucina, leucina, triptófano, valina, BCAA y EAA (aminoácidos esenciales) ($r = -0,58, -0,54, -0,71, -0,59, -0,60$ y $-0,63$, respectivamente). De forma similar, hubo una relación lineal positiva entre la diferencia en la relación C/FT y los niveles séricos de BCAA entre PRE y CRE para el grupo de proteína ($r=0.70, P = 0,05$), pero no para el grupo que tomo sacarosa durante CRE (Tabla 6)

Tabla 6. Aminoácidos en plasma.

Aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$)	Grupo Dieta durante CRE	(PRE)	Ejercicio + restricción calórica (CRE)	Dieta controlada + ejercicio limitado (CD)	Efecto tiempo	Interacción Tiempo x Dieta P (Potencia)
Alanina	Sacarosa	316 \pm 63	246 \pm 30	270 \pm 26	a,b	0.78 (0.09)
	Proteína suero	315 \pm 82	249 \pm 50	251 \pm 33		
Arginina	Sacarosa	112 \pm 27	97 \pm 15	133 \pm 35	P=0.22 (0.31)	0.82 (0.08)
	Proteína suero	137 \pm 34	120 \pm 39	124 \pm 35		
Aspargina	Sacarosa	153 \pm 22	184 \pm 17	194 \pm 34	a,b	0.19 (0.34)
	Proteína suero	168 \pm 37	192 \pm 42	182 \pm 32		
Aspartato	Sacarosa	8.6 \pm 1.3	9.6 \pm 1.3	9.4 \pm 4.1	P=0.47 (0.17)	0.46 (0.17)
	Proteína suero	9.3 \pm 2.7	9.9 \pm 1.2	8.4 \pm 2.0		
Glutamato	Sacarosa	81 \pm 18	91 \pm 115	56 \pm 11	P=0.42 (0.12)	0.33 (0.16)
	Proteína suero	75 \pm 32	52 \pm 20	62 \pm 23		
Glutamina + Histidina	Sacarosa	1330 \pm 179	1316 \pm 177	1408 \pm 175	P=0.38 (0.21)	0.40 (0.20)
	Proteína suero	1319 \pm 185	1327 \pm 239	1325 \pm 189		
Glicina	Sacarosa	240 \pm 26	241 \pm 35	256 \pm 27	b,c	0.11 (0.44)
	Proteína suero	239 \pm 41	220 \pm 34	277 \pm 33*		
Isoleucina	Sacarosa	91 \pm 16	111 \pm 9*	95 \pm 12	a,c	0.001 (0.99)
	Proteína suero	88 \pm 10	155 \pm 32*	89 \pm 18 †		
Leucina	Sacarosa	162 \pm 12	219 \pm 18*	162 \pm 12 †	a,c	0.001 (0.95)
	Proteína suero	150 \pm 22	264 \pm 44*	150 \pm 22 †		
Lisina	Sacarosa	145 \pm 21	172 \pm 34	165 \pm 19	c	0.07 (0.53)
	Proteína suero	152 \pm 29	147 \pm 26	180 \pm 43		
Metionina	Sacarosa	32 \pm 5	35 \pm 4	32 \pm 8	P=0.23 (=0.30)	0.72 (0.10)
	Proteína suero	31 \pm 4	38 \pm 11	36 \pm 10		

* $P < 0.05$ en comparación con PRE; † $P < 0.05$ en comparación con CRE;

a: $P < 0.05$ para PRE versus CRE; b: $P < 0.05$ para PRE versus CD; c : $P < 0.05$ para CRE versus CD. Valores presentados son medias \pm desviación estándar

Tabla 6. Aminoácidos en plasma (cont.)

Aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$)	Grupo Dieta durante CRE	Pre-test (PRE)	Ejercicio + restricción calórica (CRE)	Dieta controlada + ejercicio limitado (CD)	Efecto tiempo	Interacción Tiempo x Dieta P (Potencia)
Fenilalanina	Sacarosa	86 \pm 5	73 \pm 5*	71 \pm 8*	c	0.04 (0.62)
	Proteína suero	77 \pm 8	81 \pm 15	70 \pm 9		
Serina	Sacarosa	122 \pm 25	125 \pm 19	148 \pm 19*†	b,c	0.63 (0.12)
	Proteína suero	120 \pm 22	116 \pm 22	153 \pm 34*†		
Treonina	Sacarosa	142 \pm 21	147 \pm 37	172 \pm 29	c	0.08 (0.51)
	Proteína suero	164 \pm 43	131 \pm 34	162 \pm 49		
Triptofano	Sacarosa	65 \pm 9	49 \pm 9	56 \pm 10	a,b	0.47 (0.17)
	Proteína suero	66 \pm 8	59 \pm 14	55 \pm 15		
Tirosina	Sacarosa	72 \pm 13	71 \pm 22	72 \pm 22	P=0.61 (0.13)	0.49 (0.16)
	Proteína suero	61 \pm 18	75 \pm 15	64 \pm 19		
Valina	Sacarosa	296 \pm 24	314 \pm 35	272 \pm 25	a,b,c	0.001 (0.99)
	Proteína suero	281 \pm 26	418 \pm 66*	251 \pm 40 †		
BCAA	Sacarosa	549 \pm 33	644 \pm 58*	525 \pm 43 †	a,b,c	0.001 (0.99)
	Proteína suero	518 \pm 50	837 \pm 136*	480 \pm 69 †		
EAA	Sacarosa	2350 \pm 218	2437 \pm 258	2429 \pm 188	a,c	0.03 (0.79)
	Proteína suero	2326 \pm 237	2618 \pm 367*	2308 \pm 285 †		
TMAA	Sacarosa	3455 \pm 274	3502 \pm 310	3568 \pm 280	P=0.21 (0.31)	0.13 (0.41)
	Proteína suero	3450 \pm 414	3652 \pm 493	3428 \pm 353		

BCAA: Aminoácidos de cadena ramificada; TMAA: Aminoácidos totales; EAA: Aminoácidos esenciales (incluyendo glutamina)

* $P < 0.05$ en comparación con PRE; † $P < 0.05$ en comparación con CRE; a: $P < 0.05$ para PRE versus CRE; b: $P < 0.05$ para PRE versus CD;

c: $P < 0.05$ para CRE versus CD; § log-transformado. Valores presentados son medias \pm desviación estándar

5.5. Composición de cadenas pesadas de miosina en las biopsias musculares y capacidad máxima de oxidación de grasas

No hubo cambios en la composición de la cadenas pesada de miosina (MHC) con la intervención. El vasto lateral mostró una mayor proporción de MHCI en comparación con los deltoides (52.2 ± 14.4 y $41.5 \pm 5.5\%$, respectivamente). En comparación con PRE, la capacidad máxima de oxidación de grasas aumentó después de CRE en 42, 35 y 73%, para el brazo de control, el brazo entrenado y las piernas, respectivamente (Figura 5).

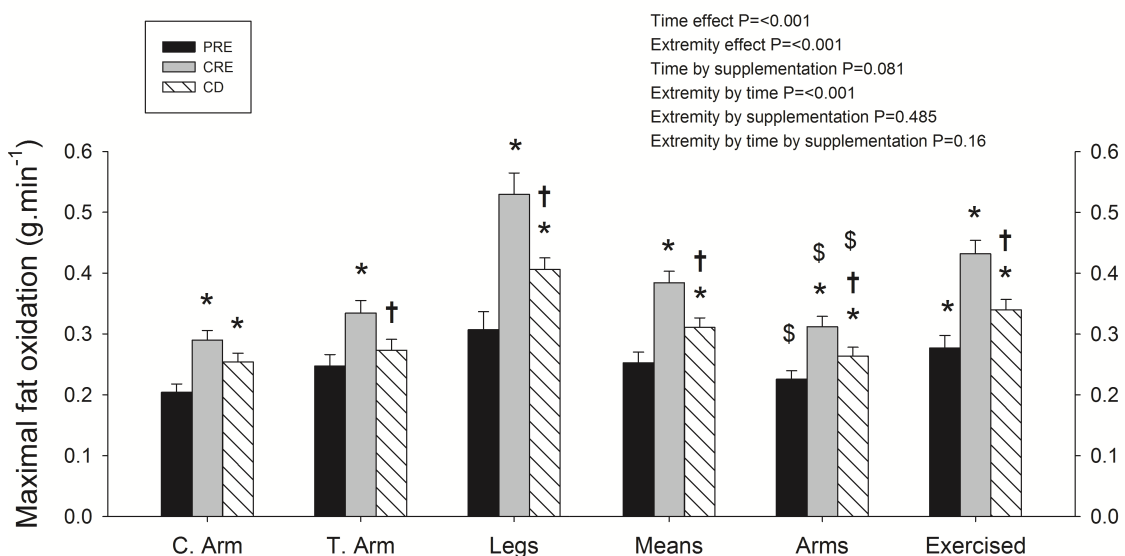
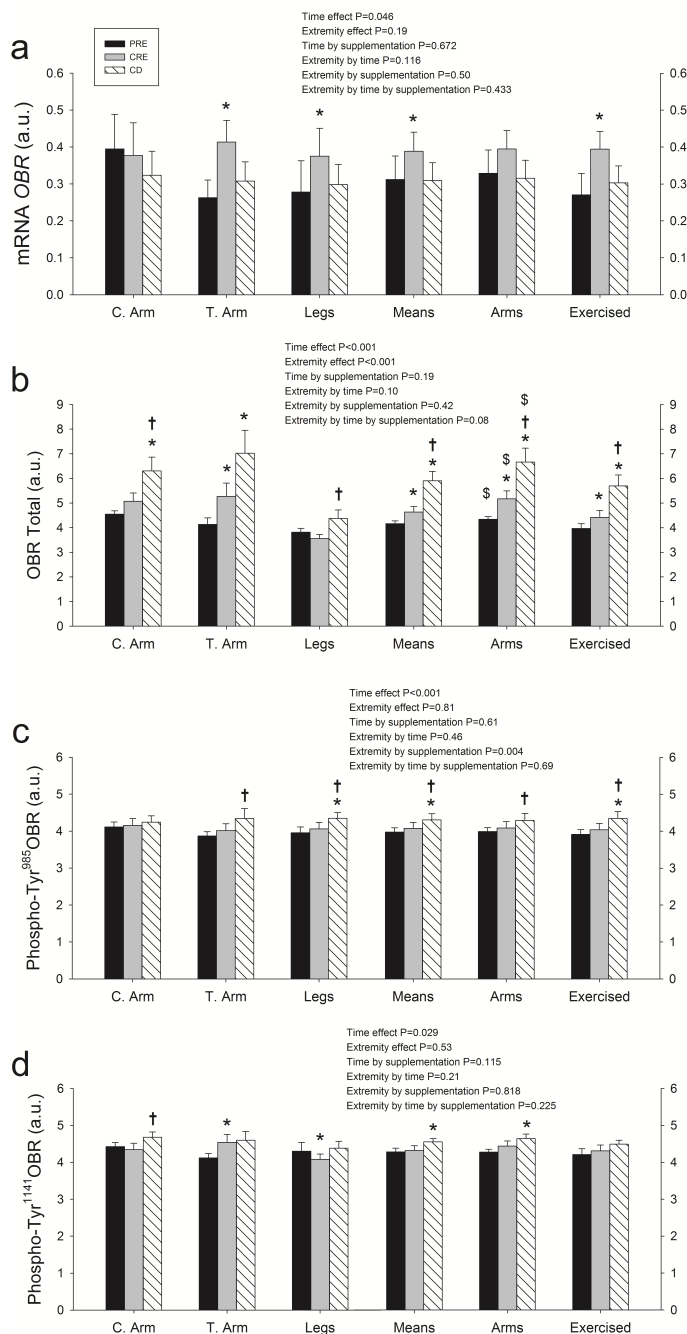


Figura 5. Máxima oxidación de grasas antes de la intervención (PRE), después de cuatro días de ejercicio prolongado (45 min de pedaleo de un brazo al 15% de la potencia alcanzada durante el ejercicio incremental hasta la extenuación, seguido de 8 h caminando aproximadamente a 4.5 km/h (CRE) y después de tres días con una dieta control isocalórica (CD). Las barras representan los valores medios para ambos grupos combinados ($n=15$) y las barras el error estándar de la media. C. Arm: brazo control, T. Arm: brazo ejercitado, Legs: piernas, Means: el valor medio de las tres extremidades, Arms: el valor medio para los brazos, Exercised: el valor medio para el brazo ejercitado y las piernas. * en comparación con PRE, † en comparación con CRE, § en comparación con las piernas.

5.6. Receptores de leptina

En comparación con PRE, el nivel de mRNA-*OBR* fue 24.5% más alto después de CRE ($P = 0.059$), debido a un aumento del 45.7% de en el brazo y las piernas ejercitados.

Después de CD, los niveles de mRNA-*OBR* volvieron a valores similares a PRE. Dado que



se obtuvieron resultados esencialmente similares cuando se analizaron por separado las tres bandas OBR identificadas a 170, 128 y 98 kDa, en los resultados se reflejan los valores totales de proteína OBR (Figura 6b).

Figura 6. Los niveles de mRNA (OBR) del receptor de leptina (a) y expresión de la proteína OBR (b), así como también de OBR fosforilado Tyr985 (c) y Tyr1141 OBR (d) antes de la intervención (PRE), después de cuatro días de ejercicio prolongado (45 min de pedaleo de brazos de un brazo al 15% de la potencia alcanzada durante el ejercicio incremental hasta la extenuación, seguido de 8 h caminando a aproximadamente 4.5 km/h (CRE), y después de tres días de dieta isocalórica (CD). El nivel de mRNA OBR fue analizado

usando datos transformados logarítmicamente. Los valores de la expresión proteica ha sido normalizado por la media de los cuatro controles internos. Las barras representan los valores medios para ambos grupos combinados ($n=15$) y las barras de error el error estándar de la media. C. Arm: brazo control, T.

Arm trained: brazo ejercitado, Means: el valor medio para las tres extremidades, Arms: el valor medio para los brazos, Exercised: el valor medio de brazo ejercitado y piernas. a.u. = unidades arbitrarias. * en comparación con el PRE, † en comparación con CRE, § en comparación con las piernas.

El nivel total de proteína OBR fue 37.7% mayor en el deltoides que en el vasto lateral. En comparación con PRE, después de CRE la expresión OBR se incrementó en un 19% en los deltoides, mientras que se mantuvo sin cambios (-6.6%, $P=0.08$) en el vasto lateral. Después de CD, se observó una elevación adicional en la proteína OBR en ambos deltoides (+ 54% en comparación con PRE) y el vasto lateral (+ 14.8%). De PRE a CD, la fosforilación fraccional de OBR en Tyr985 se redujo en un 23.7%. En el caso del vasto lateral, la fosforilación fraccional de OBR en Tyr985 aumentó en un 9.3% de PRE a CRE y luego regresó a los valores de PRE después de CD. En comparación con PRE, después de CD, fosfo-Tyr985OBR se elevó en un 8.3% (Figura 6c) y fosfo-Tyr1141OBR en un 6.3% ($P = 0,05$) (Figura 6d). De PRE a CD, la fosforilación fraccional de OBR en Tyr1141 se redujo en un 22.4% en ambos músculos deltoides y en un 8.8% en el vasto lateral.

5.7. JAK2

La expresión de la proteína JAK2 fue un 15% mayor en el deltoides que en el vasto lateral (Fig. 7). En comparación con PRE, la expresión de la proteína JAK2 fue un 10% menor ($P=0.06$) después de CRE, pero aumentó en un 14% después de CD. Estos efectos se atenuaron en los músculos ejercitados del grupo de proteína de suero de leche. Sin embargo, en comparación con PRE, la cantidad de fosfo-Tyr1007/1008-JAK2 se incrementó en un 16% después de CD (Fig. 7b). Del mismo modo, estos efectos se atenuaron en el vasto lateral del grupo que ingirió proteínas de suero de leche. De CRE a CD, la fosforilación fraccional de JAK2 aumentó en un 10%.

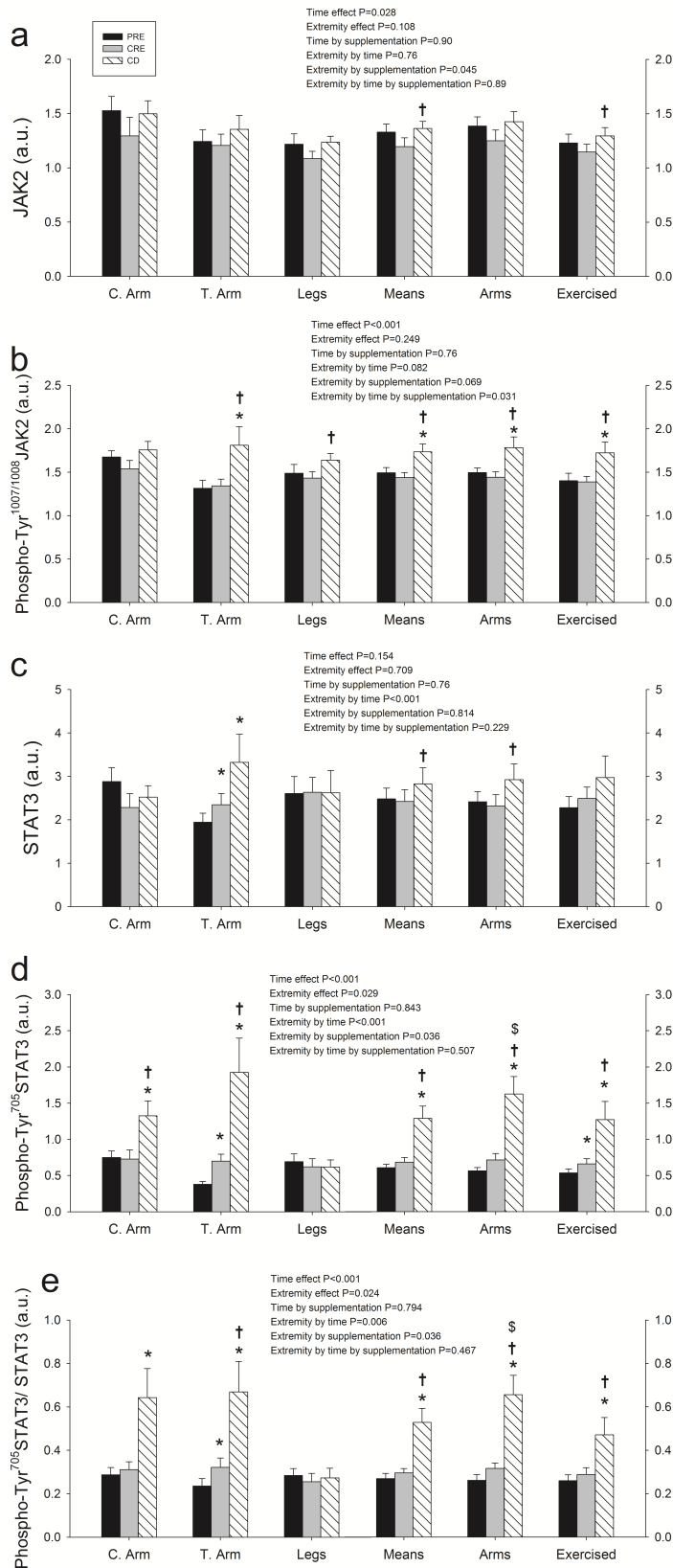


Figura 7. Los niveles de Janus kinase 2 (JAK2) (a y b) y STAT3 (c, d y e) antes de la intervención (PRE), después de cuatro días de ejercicio prolongado (45 min de pedaleo de un brazo al 15% de la potencia alcanzada durante el ejercicio incremental hasta la extenuación, seguido de 8 h caminando a aproximadamente 4.5 km/h (CRE), y después de tres días de dieta control isocalórica (CD). JAK2, STAT3, Tyr⁷⁰⁵STAT3 y Tyr⁷⁰⁵STAT3/STAT3 fue analizado usando datos transformados logarítmicamente. Los valores de expresión proteica han sido normalizados por la media de los cuatro controles internos. Las barras representan el valor medio para ambos grupos combinados (n=15) y las barras de error, el error estándar de la media. C. Arm: brazo control, T. Arm trained: brazo ejercitado, Means: el valor medio para las tres extremidades, Arms: el valor medio para los brazos, Exercised: el valor medio de brazo ejercitado y piernas. a.u. = unidades arbitrarias. * en comparación con el PRE, † en comparación con CRE, § en comparación con las piernas.

5.8. STAT3

En comparación con PRE, el nivel total de proteína STAT3 se elevó en un 70% después de la CD en el deltoides entrenado, pero permaneció sin cambios en el vasto lateral (Fig. 7c). De PRE a CD, la fosforilación de Tyr705-STAT3 aumentó en 2.9 veces en los deltoides, pero no en el vasto lateral (Fig. 7d). El aumento de fosfo-Tyr705-STAT3 fue más marcado en el grupo que ingirió sacarosa que en el tomó proteínas. La fosforilación fraccional de STAT3 se elevó 2.5 veces después de CD, pero sólo los brazos (Fig. 7e).

5.9. PTP1B y SOCS3

En comparación con PRE, la expresión de PTP1B aumentó en un 18 y 45% después de CRE y CD, respectivamente (Fig. 8). Estos efectos fueron similares en ambos grupos y en los tres músculos examinados. La expresión de la proteína SOCS3 tendió a aumentar en el vasto lateral y a disminuir en los deltoides (Fig. 8b).

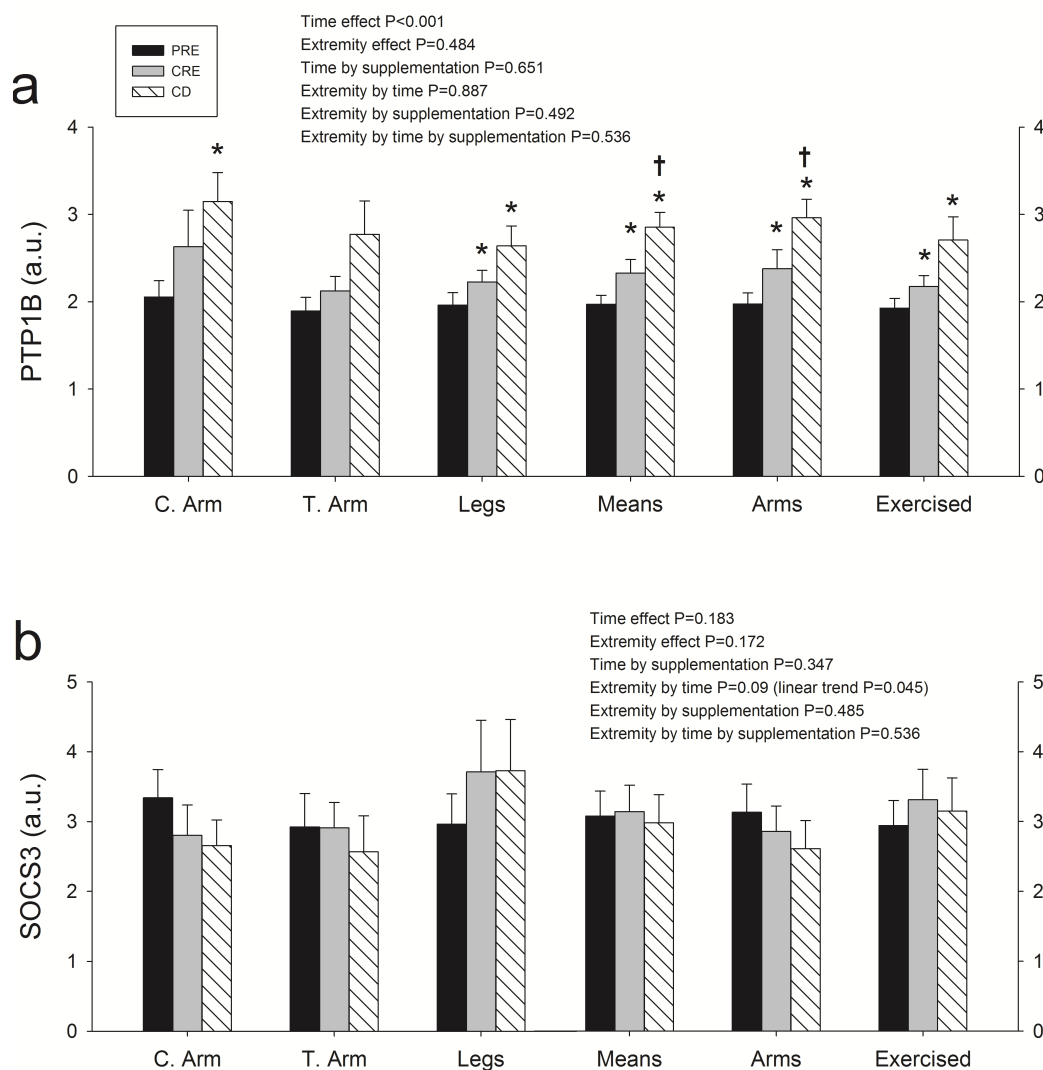


Figura 8. Los niveles de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) (a) y el supresor de señalización de citoquinas 3 (SOCS3) (b) antes de la intervención (PRE), después de cuatro días de ejercicio prolongado (45 min de pedaleo de un brazo al 15% de la potencia alcanzada durante el ejercicio incremental hasta la extenuación, seguido de 8 h caminando a aproximadamente 4.5 km/h (CRE)), y después de tres días de dieta isocalórica (CD). Los niveles de PTP1B y SOCS3 fueron analizados usando datos transformados logarítmicamente. Los valores de expresión proteica han sido normalizados para la media de los cuatro controles internos. Las barras representan el valor medio para ambos grupos combinados ($n=15$) y las barras de error el error estándar de la media. C. Arm: brazo control, T. Arm trained: brazo ejercitado, Means: el valor medio para las tres extremidades, Arms: el valor medio para los brazos, Exercised: el valor medio de brazo ejercitado y piernas. a.u. = unidades arbitrarias. * en comparación con el PRE, † en comparación con CRE.

5.10. Correlaciones

Hubo una asociación negativa entre los cambios en mRNA-OBR (media de los tres músculos) y los cambios en la insulina sérica ($r = -0,39$, $P = 0,03$, de PRE a CRE y de CRE a CD, analizados conjuntamente, $n = 30$). En las piernas, los cambios en la expresión de la proteína OBR de PRE a CRE se asociaron negativamente con los cambios en la insulina sérica ($r = -0,59$, $P = 0,021$, $n = 15$) y HOMA ($r = -0,62$, $P = 0,01$, $n = 15$). También hubo una asociación negativa entre los cambios en la concentración de leucina en suero y los cambios en la expresión de la proteína OBR ($r = -0,42$, $P = 0,02$, de PRE a CRE y de CRE a CD, analizados conjuntamente, $n = 30$). Los cambios en la fosfo-Tyr985-OBR se asociaron con los cambios en la leptina sérica ($r = 0,52$, $p = 0,03$), de PRE a CRE y de CRE a CD, analizados conjuntamente, $n = 30$). Hubo una asociación positiva entre la expresión media de la proteína JAK2 de los tres músculos y los valores de leptina ($r = 0,37$, $p = 0,01$), PRE, CRE y CD, analizados conjuntamente, $n = 45$) y HOMA ($r=0.36$, $n = 45$).

La proporción de isoforma de MHCI se asoció con la expresión de la proteína OBR ($p = -0.75$, $n = 9$), cada valor representa la media de todas las mediciones realizadas en un músculo dado), fosfo-Tyr985OBR ($r=0.88$, $n = 9$) y fosfo-Tyr705-STAT3 / STAT3 ($r=0.74$, $n = 9$).

La oxidación máxima de la grasa se asoció a la fosforilación fraccional de OBR en Tyr985 ($r=0.29$, $n=135$) y Tyr705-STAT3 ($r=0.30$, $n=135$). Estas asociaciones siguieron siendo estadísticamente significativas cuando se calcularon los valores medios para cada músculo ($r=0.66$ y $r=0.68$, $n = 9$, respectivamente).

Hubo una asociación negativa entre la concentración sérica de ácidos grasos libres de plasma y la expresión media de PTP1B (la media de los tres músculos) en PRE ($r=-0,71$, $n = 15$). Por otra parte, hubo una asociación negativa entre el aumento de la expresión de PTP1B y el aumento de la concentración sérica de ácidos grasos libres ($r=-0,43$, $n = 30$).

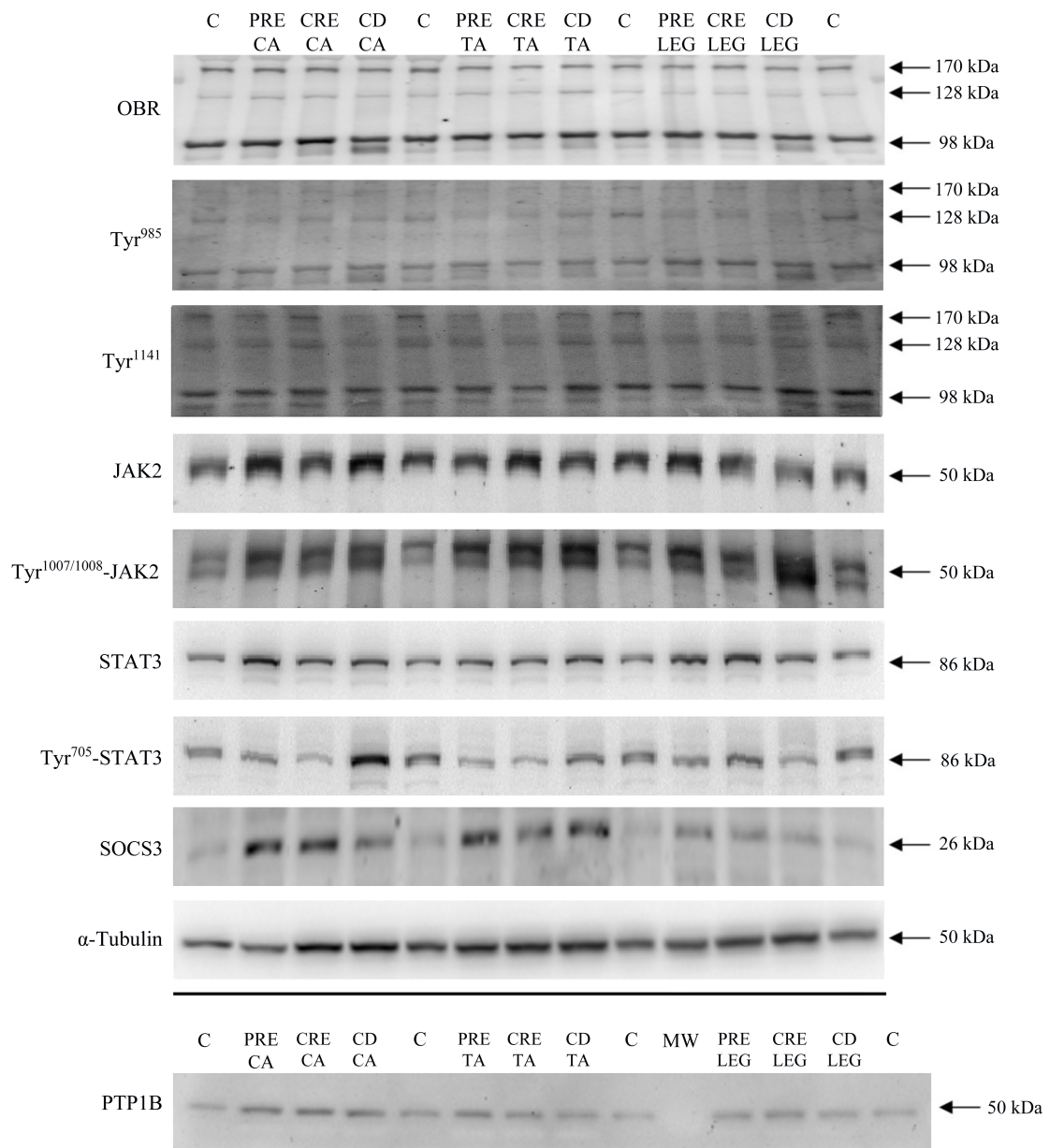


Figura 9. Western blots representativos

5.11. Validez y fiabilidad del analizador portátil de gases COSMED K5

Exactitud

El analizador COSMED K5 sobreestimó el VO_2 de reposo en un 13.5% ($P=0.034$), pero no VCO_2 ($P = 0,67$) (Tabla 9). Hubo un excelente acuerdo entre los métodos de RR, V_t , V_E y FeO_2 , mientras que el K5 sobreestimó el FiO_2 en un 1,9% ($P < 0.001$) y subestimó el FeCO_2 en un 8,6% y el FiCO_2 en un 85,8%. En consecuencia, el K5 subestimó el RER en un 13.8% ($P < 0.001$). El efecto combinado sobre el gasto de energía fue un 4.8% mayor con el K5 que con el Vyntus ($P= 0.42$) pero esta diferencia no alcanzó significación estadística (Tabla 9).

Confiabilidad

El analizador COSMED K5 tuvo una excelente reproducibilidad durante las pruebas de campo (Tabla 10), a pesar de pequeños cambios en la velocidad de marcha, peso inicial y condiciones ambientales (Tablas 11). El gasto energético total por Km se determinó con un CV para mediciones repetidas de 4.5% (IC: 3.2-6.9%) y CCC de 0.91, similar a la variabilidad del VO_2 . Esta alta reproducibilidad se explicó por la baja variación de las mediciones de FeO_2 , que tuvo un CV de 0.9% (IC: 0.7-1.5%) combinado con una variabilidad ligeramente mayor de FeCO_2 , V_E , VCO_2 y RER.

Tabla 10. Precisión del K5 durante medición prolongada en test de campo

	1ª medida		2ª medida		%CV	95% CI	(CCC)	P-Valor
	Media	SD	Media	SD				
Masa corporal Pre (kg)	73.4 ± 10.5		74.0 ± 10.8		0.97	0.70 - 1.51	1.00	0.014
Masa corporal Post (kg)	72.9 ± 10.4		73.4 ± 10.7		1.02	0.73 - 1.58	0.99	0.093
Diferencia en masa corporal (kg)	-0.45 ± 0.30		-0.59 ± 0.31		72.05	44.08 - 175.55	0.40	0.139
VO ₂ (mL/min)	1,193 ± 223		1,220 ± 248		4.42	3.18 - 6.85	0.95	0.180
VCO ₂ (mL/min)	1,000 ± 212		1,033 ± 212		6.23	4.47 - 9.66	0.92	0.130
RER	0.84 ± 0.04		0.85 ± 0.03		3.36	2.41 - 5.20	0.41	0.269
Rf (1/min)	27.1 ± 4.9		27.8 ± 5.0		3.88	2.78 - 6.01	0.95	0.088
VE (L/min)	31.2 ± 5.9		32.5 ± 6.3		6.86	4.91 - 10.62	0.89	0.079
VT (L) (btps)	1.18 ± 0.25		1.20 ± 0.25		6.41	4.58 - 9.91	0.91	0.581
VE/VO ₂	26.4 ± 1.9		26.9 ± 2.5		3.94	2.83 - 6.11	0.76	0.165
VE/VCO ₂	31.6 ± 2.7		31.8 ± 3.0		3.42	2.46 - 5.31	0.84	0.657
FiO ₂	20.93 ± 0.00		20.93 ± 0.00		0.01	0.01 - 0.01	0.63	0.336
FeO ₂	16.49 ± 0.33		16.55 ± 0.42		0.95	0.68 - 1.46	0.82	0.311
FiCO ₂	0.04 ± 0.00		0.04 ± 0.00		4.28	3.06 - 6.60	0.63	0.336
FeCO ₂	3.88 ± 0.34		3.87 ± 0.38		3.35	2.41 - 5.19	0.87	0.843
EE (kcal/min)	5.8 ± 1.2		5.9 ± 1.2		5.22	3.75 - 8.09	0.94	0.136
TEE (kcal)	796.9 ± 112.9		816.5 ± 126.2		4.54	3.26 - 7.03	0.91	0.151
TEE/km	61.5 ± 8.9		62.9 ± 9.8		4.45	3.20 - 6.90	0.91	0.168
TEE/kg	61.5 ± 8.9		62.9 ± 9.8		4.45	3.20 - 6.90	0.91	0.168
TEE/km/kg	0.84 ± 0.08		0.85 ± 0.10		4.56	3.27 - 7.06	0.79	0.376
HR (bpm)	105.2 ± 14.0		99.6 ± 14.2		6.96	5.00 - 10.81	0.76	0.028
Velocidad GPS (km/h)	5.47 ± 0.51		5.45 ± 0.47		2.71	1.95 - 4.20	0.91	0.776
Distancia total GPS (m)	12,967 ± 72		12,983 ± 57		0.40	0.29 - 0.62	0.35	0.436

CCC; coeficiente de correlación de concordancia; VO₂, consumo de oxígeno; VCO₂, producción de dióxido de carbono; RER, cociente de intercambio respiratorio; Rf, frecuencia respiratoria; V_E, ventilación; V_T, volumen corriente; V_E/VO₂, equivalente ventilatorio para el O₂; V_E/VCO₂, equivalente ventilatorio para el CO₂; EE, gasto energético, TEE, gasto energético total; HR, frecuencia cardiaca; (n=14).

Tabla 11. Condiciones ambientales durante los tests de campo.

		1ª medida		2ª medida		P-Valor
		Media	SD	Media	SD	
Temperatura ambiente	Temp. promedio (°C)	22.06	3.08	22.44	2.25	0.726
	Temp. inicial (°C)	22.65	3.55	22.96	3.54	0.833
	Temp. final (°C)	20.79	2.24	21.55	3.80	0.495
	Dif. Temp. Ambiente (°C)	-1.86	2.76	-1.41	3.86	0.715
Humedad ambiental relativa (HR)	HR promedio (%)	61.66	8.72	63.49	9.13	0.505
	RH inicial (%)	61.36	10.31	63.14	13.89	0.666
	RH final (%)	66.50	6.47	65.79	14.46	0.859
	Diferencia HR (%)	5.14	8.36	2.64	18.53	0.636
Presión barométrica (PB)	PB promedio (mmHg)	765.81	2.92	764.36	3.26	0.308
	PB inicial (mmHg)	766.14	3.18	764.71	3.22	0.342
	PB final (mmHg)	766.07	2.87	764.64	3.25	0.319
	Diferencia PB (mmHg)	-0.07	0.92	-0.07	0.73	1.000

Temp., temperatura; SD, desviación estándar

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los estudios incluidos en esta tesis doctoral han demostrado que el desarrollo de un modelo de adelgazamiento, para su posterior comercialización en el mercado de turismo de salud en Canarias es factible, permite lograr adelgazamientos considerables en las ventanas temporales mayormente comercializadas en Canarias. Además, hemos demostrado que este modelo de ejercicio permite disminuir la pérdida de masa muscular, atenuar el deterioro de la función muscular debido al déficit energético y comporta cambios favorables en indicadores bioquímicos de riesgo cardiovascular, la leptina y la señalización por leptina en el músculo esquelético humano. Además hemos demostrado, que los músculos de los brazos responden de forma diferente a los músculos de las extremidades inferiores al déficit energético severo y que un volumen elevado de ejercicio puede atenuar parte de los efectos negativos de la restricción calórica en la masa muscular. Finalmente, hemos demostrado que el metabolímetro K5 es adecuado para medir el gasto energético durante largas caminatas, posibilitando en estudios posteriores desarrollar un mapa de senderos de interés para adelgazamiento con cuantificación del déficit energético esperable en cada ruta.

Efectos en la masa grasa

Este estudio revela que la masa grasa corporal puede ser reducida en ~ 3 kg con una intervención de 4 días combinando una reducción de la ingesta energética (a apenas 10% del nivel habitual) y 9 horas de ejercicio de baja intensidad por día. Curiosamente, la mayor parte de esta reducción se debió a la pérdida de depósitos adiposos en el tronco. Además, a pesar de no haber pedido específicamente cambios en el estilo de vida, los sujetos perdieron un kilo adicional de grasa durante las cuatro semanas posteriores a la intervención logrando una pérdida total de grasa de 3.8 kg (de los cuales 2.8 kg provinieron del tronco) (Calbet et al. 2015).

Este resultado es superior al logrado con varias intervenciones que combinan dietas bajas en calorías y ejercicios que duran de 12 semanas a un año (Garrow and

Summerbell 1995; Shaw 2009; Willis et al. 2012). Además, la pérdida de grasa media registrada en este estudio supera a la obtenida mediante la administración durante 20 semanas de agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) (lo que dio una pérdida media ponderada de 2.9 kg en 21 ensayos con 6411 participantes) (Vilsboll et al. 2012). Curiosamente, un año después de la intervención, la masa de grasa del cuerpo entero estaba todavía 1.9 kg por debajo del nivel previo a la intervención, es decir, los sujetos habían recuperado sólo el 50% de la grasa que perdieron. Este resultado supera a los descritos en meta-análisis recientes (Anderson et al. 2001; Kraschnewski et al. 2010).

Efectos en la masa magra y el rendimiento

En esta investigación hemos determinado la capacidad de la ingestión de suplementos proteicos y del ejercicio para preservar la masa del músculo esquelético y su función durante cuatro días de déficit energético severo. Un brazo realizó 45 minutos de ejercicio de baja intensidad (el otro brazo sirvió como control "sedentario"), mientras que las piernas fueron ejercitadas durante 8 horas diarias, un nivel excepcional de actividad. Los tres músculos examinados fueron expuestos a niveles similares de aminoácidos circulantes y señales endocrinas, pero diferentes cantidades de ejercicio. Por lo tanto, este diseño experimental ha permitido examinar si la respuesta catabólica a un déficit de energía diaria severa similar a la observada en las competiciones de triatlón de tipo Ironman (Kimber et al. 2002), pero repetida durante cuatro días consecutivos, afecta de manera diferente a los brazos y los músculos de las piernas.

Además, al tener un grupo de sujetos sin ingesta de proteínas, hemos sido capaces de probar específicamente si la ingesta de proteína potencia el efecto de ahorro de masa magra del ejercicio durante dietas tipo VLCD.

Los hallazgos presentes demuestran claramente que el ejercicio tiene una notable capacidad para conservar la masa magra, incluso con un déficit de energía de casi 23 MJ/día (Calbet et al. 2015). Tan sólo 45 minutos de ejercicio de baja intensidad atenuaron la pérdida de masa muscular del brazo en un 29% en comparación con la observada en el brazo de control no ejercitado. Comparado con el brazo de control, 8

horas de caminata redujeron la pérdida de masa magra de las piernas en un 57%, lo que indica que el efecto protector del ejercicio aumenta con una actividad contráctil más prolongada. Sin embargo, la capacidad máxima de ejercicio se deterioró sólo durante el pedaleo de la pierna, como lo reflejan los valores bajos de VO_2 pico y W_{peak} después del déficit energético severo y en mayor medida en el grupo de proteína de suero de leche que en el grupo de sacarosa.

La proteína de suero es rica en aminoácidos de cadena ramificada y estimula eficazmente la síntesis de proteínas y atenúa la degradación de proteínas en seres humanos (Pennings et al. 2011; Phillips 2011). La ingesta diaria total de proteína de suero de leche (0.8 g/kg de peso corporal) empleada aquí excedió en gran medida la cantidad requerida para lograr la estimulación máxima de la síntesis de proteínas, que es de unos 20 g (Breen et al. 2011; Tang et al. 2009; Yang et al. 2012). Puesto que después de ajustar la reducción en el agua corporal extracelular nuestros sujetos perdieron aproximadamente 380 g de masa magra por día durante la fase CRE, la cantidad de proteína ingerida debería haber sido suficiente para evitar estas pérdidas. Sin embargo, nuestros hallazgos indican que bajo un déficit energético tan severo, la proteína de suero de leche no tiene un efecto ahorrador detectable sobre la masa magra y, por consiguiente, el grupo que recibe proteína de suero perdió la misma cantidad de masa magra que el grupo que sólo recibió sacarosa. Queda por determinar si se puede lograr una mejor preservación de la masa magra con una ingesta mayor o con otros tipos de proteínas (Agus et al. 2000; Carbone et al. 2012). No podemos descartar la posibilidad de que la ingesta de proteínas pueda ejercer efectos positivos durante una intervención más larga o con un déficit energético más moderado (Pasiakos et al. 2013).

Efectos metabólicos

La reducción de la masa corporal del 5-10% se asocia a mejoras de los niveles plasmáticos de colesterol, colesterol HDL, relación colesterol/HDL-colesterol, sensibilidad a la insulina, así como en la tensión sistólica y diastólica en reposo (Brochu et al. 2003; Ross et al. 2000). En concordancia, los niveles de colesterol total, colesterol

LDL y triglicéridos en el suero se redujeron inmediatamente después del período de cuatro días de ejercicio combinado con restricción calórica severa. Sin embargo, después del período subsiguiente de 3 días de dieta normal y ejercicio limitado, el nivel de colesterol HDL volvió al valor basal, a pesar de la reducción adicional de 0.7 kg en la masa grasa durante este mismo período, reflejando la importancia que tiene el mantener una actividad contráctil elevada para mantener las mejoras en colesterol HDL.

En desacuerdo con nuestra hipótesis, la magnitud y la distribución regional de la pérdida de grasa fue similar en los grupos que ingirieron solamente sacarosa o proteína de suero de leche. En estudios nutricionales previos, la elevación de la cantidad relativa de proteína en la dieta dio como resultado una pérdida de grasa más pronunciada y una mejor preservación de la masa magra (Farnsworth et al. 2003; Krieger et al. 2006). Las dos diferencias principales entre nuestros resultados y los anteriores son el número de Kcal ingerido diariamente y la magnitud del déficit energético sostenido en cada día de ejercicio.

Efectos sobre la leptina y sus cascadas de señalización en el músculo esquelético humano

Estos estudios han demostrado que la cascada de señalización de la leptina está aumentada en el músculo esquelético humano en respuesta a un grave déficit energético. La combinación de ejercicio y una dieta muy baja en calorías promueve la expresión del gen *OBR*, como se refleja en el aumento de mRNA-*OBR* en los brazos ejercitados y los músculos de las piernas después de cuatro días de caminata prolongada. Esta expresión aumentada del gen *OBR* se acompaña de un aumento en el nivel de expresión de la proteína correspondiente en el brazo ejercitado después de CRE, y en ambos brazos y piernas después de CD.

Aunque la comparación entre el brazo y los músculos de las piernas debe interpretarse con cautela debido a las diferencias en los patrones de actividad física, la estructura muscular y la plasticidad (Zinner et al. 2016), el hecho de que los niveles de proteína de *OBR* aumentaron tanto en el brazo ejercitado como en el brazo control

indica que el mecanismo subyacente primario que impulsa este aumento debe estar más relacionado con el déficit energético que con la actividad contráctil local. La falta de aumento de la cantidad de proteína OBR en el vasto lateral después de cuatro días de caminata apoya aún más esta conclusión. A pesar del aumento de la expresión de OBR en los brazos después de cuatro días de déficit energético severo, no hubo signos de aumento de la señalización por leptina en los brazos o en los músculos de las piernas, probablemente debido al aumento de la expresión de PTP1B, independiente de la cantidad de ejercicio realizado por cada músculo individual.

Curiosamente, cuando los sujetos volvieron a su dieta normal con ejercicio reducido, el nivel de la proteína OBR se elevó aún más en los brazos y también aumentó en el vasto lateral. Esta regulación positiva de la expresión OBR fue acompañada por una mayor señalización de la leptina en los músculos del brazo, como se refleja por el aumento de las fosforilaciones Tyr1007/1008-JAK2, Tyr1141-OBR y Tyr705-STAT3, a pesar de una mayor elevación de la expresión de PTP1B. Sin embargo, en el vasto lateral, a pesar de la fosforilación aumentada de JAK2 y Tyr985-OBR, las fosforilaciones de Tyr1141OBR y Tyr705-STAT3 permanecieron sin cambios, lo que indica que en el vasto lateral únicamente se activaron los pasos iniciales de la cascada de señalización de leptina. Esta situación puede explicarse por el aumento de la expresión de SOCS3 en las piernas, pero no en los brazos, como lo revela la interacción en el análisis de ANOVA. A concentraciones normales, SOCS3 sólo puede inhibir la señalización de la leptina mediante la unión a Tyr985 en el OBR, pero sin fosforilación en la Tyr985 de OBR, SOCS3 carece de capacidad inhibitoria (Bjørnbæk et al. 2000). La combinación de ambos eventos, fosforilación de Tyr985-OBR y el aumento de los niveles de proteína SOCS3, aborta la fosforilación de Tyr705-STAT3 por JAK2 (Bjørnbæk et al. 2000).

El aumento adicional de la expresión de PTP1B desde CRE a CD, puede servir como un mecanismo de retroalimentación para impedir una sobreactivación de la señalización de leptina cuando la expresión de OBR está aumentada y concomitantemente la concentración de leptina en suero está aumentada con respecto al final de CRE, pero aún por debajo de los niveles de PRE. A pesar de este

aumento en la PTP1B, su influencia inhibitoria sobre la señalización de la leptina no fue suficiente para prevenir completamente la regulación positiva de OBR observada tres días después de la reanudación de la dieta isocalórica. Esta regulación positiva de OBR podría haber sido facilitada por la reducción sostenida y marcada de la leptina circulante durante los cuatro días de caminata y los siguientes tres días en una dieta controlada.

Aunque los receptores de leptina han sido regulados en varios tipos de cáncer (Ishikawa et al. 2004; Qian et al. 2015; Uddin et al. 2010; Uddin et al. 2009), la presente investigación es la primera en demostrar la regulación positiva de la OBR del músculo esquelético en hombres sanos en respuesta al déficit energético severo. De acuerdo con nuestros resultados, se ha demostrado que el ayuno aumenta la expresión de OBR en células de leucemia linfoblástica aguda en ratones, un efecto que requiere una reducción en los niveles circulantes de leptina (Lu et al. 2017). El aumento de los receptores de leptina a través del ayuno ejerce efectos antiproliferativos pronunciados en las células de leucemia linfoblástica (Lu et al. 2017).

La expresión de PTP1B en el músculo esquelético se incrementa en respuesta a un déficit energético severo

En estos estudios hemos demostrado que durante un déficit energético severo la expresión de PTP1B está aumentada en el músculo esquelético humano. Este efecto fue independiente de la actividad contráctil local y fue similar en el brazo y en los músculos de las piernas. La expresión de PTP1B puede estar regulada por glucosa, leptina y citocinas inflamatorias tales como TNF α e interleucinas (Lam et al. 2004; MohammadTaghvaei et al. 2012; Popov et al. 2009; Zabolotny et al. 2008). Además, se ha informado que los ácidos grasos libres inducen la expresión de PTP1B en cultivos celulares (MohammadTaghvaei et al. 2012; Obanda and Cefalu 2013). En contraste, se observó una asociación negativa entre la concentración basal de ácidos grasos libres en suero y el nivel basal de la proteína PTP1B en el músculo esquelético, y más importante todavía, entre los cambios en PTP1B y los ácidos grasos libres en suero.

El aumento de la señalización por la leptina en el músculo esquelético fue acompañada por una elevada expresión de PTP1B, que causa resistencia tanto a la insulina (Stull et al. 2012; Zabolotny et al. 2004) como a la leptina (Cheng et al. 2002). La resistencia a la insulina en el músculo esquelético durante el déficit energético severo preserva la glucosa en la sangre para los tejidos dependientes de la glucosa, como el sistema nervioso central (Cahill 2006), mientras que el aumento de la señalización por leptina facilita la oxidación de los ácidos grasos (Wolsk et al. 2011). Esto está de acuerdo con la asociación observada aquí entre la capacidad máxima de oxidación de grasa y la señalización de leptina durante la fase PRE, apoyando la idea de que el aumento de la señalización por leptina en el músculo esquelético durante el déficit energético severo facilita la utilización de grasas como sustrato energético prioritario.

Regulación de la expresión de OBR en el músculo esquelético

Nuestros resultados indican que los receptores de leptina son más abundantes en las fibras de contracción rápida. Este hallazgo coincide con estudios previos en seres humanos que informaron una mayor expresión de la proteína OBR en el tríceps braquial (Olmedillas et al. 2010) o el deltoides (Fuentes et al. 2010) que en el vasto lateral, ya que los dos primeros músculos contienen una mayor proporción de fibras de contracción rápida (Fuentes et al. 2010; Olmedillas et al. 2010; Zinner et al. 2016). Nuestros resultados también concuerdan con el aumento del nivel de mRNA-OBR después de la inmovilización, que se sabe que promueve un cambio de lento a rápido en las fibras musculares (Chen et al. 2007). Una mayor expresión de OBR en el músculo de los brazos podría servir para compensar parcialmente su menor sensibilidad a la leptina basal en comparación con los músculos de las piernas.

En la presente investigación, el aumento de la proteína OBR se produjo durante el déficit energético severo y no fue influenciado por 45 minutos de pedaleo de un brazo, lo que sugiere que este volumen e intensidad de ejercicio no tiene efecto sobre la expresión muscular de OBR. Sin embargo, las caminatas largas (8h diarias) impidieron un aumento de la expresión de OBR en el vasto lateral, que sólo ocurrió

cuando la cantidad de actividad física se redujo y la dieta normal se restableció. Este hallazgo podría indicar que la actividad contráctil prolongada puede inhibir la expresión de OBR en el vasto lateral, que de otro modo debería haber sido estimulada por la reducción en el nivel circulante de leptina de PRE a CRE.

Aunque se sabe poco sobre la regulación endocrina de la expresión de OBR en los músculos esqueléticos humanos, se ha demostrado que la leptina, la insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), la testosterona y el estradiol influyen en la expresión de OBR en cultivos celulares, tanto en roedores (Alonso et al. 2007; Eguchi et al. 2007; Hikita et al. 2000) como en tejidos humanos (Ishikawa et al. 2007). Sin embargo, dado que los tres músculos esqueléticos examinados aquí presumiblemente estaban expuestos a concentraciones similares de hormonas circulantes, la diferencia en las respuestas de los músculos de los brazos y piernas con respecto a la expresión de OBR también debe implicar factores locales. Las mujeres tienen niveles más altos de estrógenos y de testosterona en plasma que los hombres, pero expresan dos veces más proteína OBR en su vasto lateral (Guerra et al. 2008). Aunque el nivel sérico total de testosterona y el índice de andrógenos libres se redujeron significativamente después de los cuatro días de marcha (Calbet et al. 2017), no se observó asociación entre los cambios en la expresión de la proteína OBR y los cambios en la testosterona total y el índice de andrógenos libres.

Tal y como se describe en el Artículo 1, nuestros sujetos experimentaron una marcada reducción de la insulina sérica y HOMA después de los cuatro días de ejercicio con restricción calórica (Calbet et al. 2015). Aunque en las líneas celulares de cáncer la insulina aumenta la expresión de OBR (Garofalo et al. 2006), no se observó asociación entre los cambios en los niveles séricos de insulina y la expresión de OBR.

La ingestión de proteína de suero de leche durante el déficit de energía severo atenúa parcialmente la señalización de leptina sin influir en la expresión de OBR en el músculo esquelético

En ratas alimentadas con una dieta rica en grasas, la suplementación con leucina se asocia con una mayor expresión de OBR en el hipotálamo y tejido adiposo, mientras

que reduce los niveles séricos de leptina (Yuan et al. 2015). Mao et al. (2013) demostraron que la suplementación dietética de leucina a ratones durante 14 días estimula de manera significativa tanto la expresión de ARNm como de proteína de OBR en los músculos esqueléticos. En contraste, aquí se observó una asociación negativa entre los cambios en OBR y leucina. Por otra parte, encontramos aumentos similares de expresión de la proteína OBR en ambos grupos, a pesar de un nivel sérico de leucina un 20% más alto en el grupo que ingirió proteínas durante CRE. En seres humanos la suplementación con BCAA no se ha asociado con niveles séricos reducidos de leptina (Yuan et al. 2015), mientras que en otros estudios con roedores los resultados son contradictorios. Por lo tanto, el sistema de leptina/OBR parece responder al aumento de leucina en suero de manera diferente en roedores y seres humanos.

Validez y fiabilidad del analizador portátil de gases COSMED K5

Este estudio muestra que las medidas de gastos energético obtenidas en reposo con el nuevo espirómetro portátil COSMED K5 concuerdan con las obtenidas con el metabolímetro Vyntus en reposo, que ha sido recientemente comercializado por la compañía CareFusion como un nuevo carro metabólico basado en sus predecesores JAEGER Oxycon Pro y SensorMedics™ Vmax™ Encore. Sin embargo, el K5 no es apropiado para la evaluación de la oxidación de los sustratos energéticos en reposo debido a una pequeña sobrestimación del VO_2 , lo que resulta en la subestimación del RER real, cuando se trabaja en el modo de cámara de mezclas. Nuestros resultados también indican que el K5 tiene una excelente fiabilidad durante el registro prolongado en el campo.

Validez de COSMED K5

La evaluación de la tasa metabólica en reposo tiene algunas dificultades debido a la variabilidad intrínseca del metabolismo en reposo, que puede ser fácilmente alterada por varios factores (Compher et al. 2006 12610). Idealmente, la ingesta de alimentos, el ejercicio, las drogas y las condiciones ambientales deben ser controlados. Las mediciones deben realizarse al menos 6 horas después de la última comida, pero

evitando períodos de ayuno de más de 12 horas, a la misma hora del día, después de un sueño de duración normal durante la noche anterior (Spaeth et al. 2015 12624) (Compher et al. 2006 12610). Se debe tener especial cuidado en evitar factores conocidos que alteran el RMR como el etanol, la cafeína y la nicotina, por lo menos durante las 24h que preceden a las pruebas.

El ejercicio también puede alterar RMR y el efecto del ejercicio puede durar 12-24h o más horas, tras ejercicios prolongado (Bahr 1992 9667). Por lo tanto, debe evitarse 24 h antes de las mediciones el ejercicio inusual y prolongado. La medición de RMR debe realizarse durante al menos 10 minutos después de que el sujeto haya estado descansando cómodamente durante un mínimo de 20 minutos en un medio ambiente termoneutro (Compher et al. 2006 12610). En nuestros estudios controlamos todos estos factores, que en cualquier caso deberían haber afectado de igual manera a las medidas obtenidas con el Vyntus y el K5.

En la presente investigación se utilizó el carro metabólico Vyntus CareFusion como método de referencia. Aunque Vyntus es un carro metabólico relativamente nuevo y no se dispone de datos sobre su validez frente al método de saco de Douglas, su precesor Oxycon Pro resultó válido (Foss and Hallen 2005 9267). Además, esto se ha confirmado para el Vyntus cuando se valida indirectamente frente al Vmax29 (Carlomagno et al. 2015 12617). Comparado con Vyntus, K5 midió con excelente concordancia los valores de V_E , V_T y FeO_2 , por lo que la sobreestimación del VO_2 es probable debido a las diferencias en los algoritmos computacionales y al hecho de que Vyntus mide el FIO_2 y $FICO_2$ en lugar de asumir valores fijos para estas dos variables.

Más preocupante es el hecho de que el RER en reposo fuese cercano a 0.70 con el K5, valor demasiado bajo para sujetos que han estado ayunando sólo durante la noche (Compher et al. 2006 12610). Este RER tan bajo es en parte causado por la sobreestimación del VO_2 , pero también pueden estar implicadas diferencias en la medición de CO_2 , ya que los valores de $FeCO_2$ de K5 fueron 8.6% más bajos que los valores de $FeCO_2$ de Vyntus. Nuestros hallazgos coinciden con los menores valores de VCO_2 medidos por el sistema portátil K4B2 comparado con el sistema portátil Cortex

Metamax II (Lepretre et al. 2012 12695), así como con el rendimiento reportado para el predecesor del K5, el K4B² al trabajar respiración a respiración (Duffield et al. 2004 12696).

La imprecisión en F_iCO_2 puede deberse a varios factores que incluyen la falta de equilibrio adecuado del vapor de agua entre el medio ambiente y los tubos de muestreo de Nafion. Sin embargo, los tubos de Nafion estaban en perfecto estado en ambos analizadores y habían sido cambiados antes del inicio de las pruebas. Por otra parte, la humedad ambiental fue de alrededor del 60%, reduciendo la posibilidad de condensación de agua dentro de los tubos de Nafion, que de haber ocurrido habría afectado ambos analizadores de manera similar, ya que Vyntus y K5 usan el mismo procedimiento para equilibrar la presión de H_2O entre el interior y el exterior de los tubos de Nafion.

Fiabilidad de K5

Este estudio muestra que el K5 puede evaluar el VO_2 y el gasto de energía durante la marcha prolongada con un CV por debajo del 5%, es decir, con una estabilidad comparable a la obtenida con carro metabólicos estacionarios (Carter and Jeukendrup 2002 12693). Por lo tanto, cuando el K5 se opera en modo caja de mezclas tiene una precisión que parece exceder a la conseguida por su predecesor el K4b² (Howe et al. 2014 12595) (Brisswalter and Tartaruga 2014 12690; Darter et al. 2013 12694; Schrack et al. 2010 12579).

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Los trabajos incluidos en esta tesis doctoral han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) En hombres con sobrepeso u obesidad es posible conseguir una pérdida de peso clínicamente relevante, mayormente a expensas de la masa grasa, con cuatro días de ejercicio prolongado en combinación con restricción calórica severa.
- 2) Durante el déficit energético severo de hasta 5500 Kcal/d sostenidos durante cuatro días el ejercicio resulta en una notable preservación de la masa magra. Este efecto no requiere la ingestión de proteínas y puede lograrse con ejercicios de baja intensidad, como caminar o arrancar el brazo.
- 3) Aunque un pequeño volumen de ejercicio diario puede atenuar la pérdida de masa magra en alrededor del 30%, se puede lograr una mayor preservación con sesiones de ejercicio más largas.
- 4) Durante el déficit energético severo la administración de una solución de proteína sin carbohidratos puede causar un aumento mayor en el nivel plasmático de cortisol y el índice catabólico (cortisol testosterona) que la administración de solo carbohidratos.
- 5) El efecto preservador de masa magra del ejercicio parece limitado a los músculos ejercitados y puede ser diferente para los músculos de las extremidades superiores e inferiores en los seres humanos.
- 6) La cascada de señalización de leptina en el músculo esquelético humano está aumentada en respuesta a un déficit energético severo.
- 7) Los receptores de leptina se expresan de manera diferente en el brazo y los músculos esqueléticos de la pierna con mayores niveles de expresión en las fibras de contracción rápida.

- 8) La ingestión de proteína o sacarosa por sí sola no influye en la regulación de los receptores de leptina, pero la proteína de suero de leche podría atenuar en parte la cascada de señalización de leptina en respuesta a un déficit energético severo.
- 9) La expresión de PTP1B en el músculo esquelético está regulada positivamente en respuesta al déficit energético severo, atenuando la activación de la cascada de señalización por leptina.
- 10) El metabolímetro K5 de COSMED presenta gran fiabilidad, incluso en condiciones de funcionamiento ininterrumpido durante dos horas.
- 11) Los datos recogidos demuestran que sería posible desarrollar un producto orientado al turismo de salud ofertando un programa de ejercicio y dieta capaz de producir adelgazamiento clínicamente relevante en menos de una semana.

CONCLUSIONS

8. CONCLUSIONS

The studies included in this doctoral thesis have led to the following conclusions:

- 1) In overweight or obese men it is possible to achieve a clinically relevant weight loss, mostly at the expense of fat mass, with four days of prolonged exercise in combination with severe caloric restriction.
- 2) During a severe energy deficit up to 5500 Kcal/d sustained for four days, exercise results in a remarkable preservation of lean mass. This effect does not require the ingestion of proteins and can be achieved with low-intensity exercises, such as walking or arm cranking.
- 3) Although a small volume of daily exercise can attenuate lean mass loss by about 30%, greater preservation can be achieved with longer exercise sessions.
- 4) During a severe energy deficit, the administration of a protein solution without carbohydrates can cause a greater increase in the plasma level of cortisol and the catabolic index (cortisol/testosterone) than the administration of only carbohydrates.
- 5) The lean body mass preservation effect of exercise seems limited to exercised muscles and may be different for muscles of the upper and lower limbs in humans.
- 6) The leptin signaling cascade in human skeletal muscle is up-regulated in response to a severe energy deficit.
- 7) Leptin receptors are expressed differently in the arm and leg skeletal muscles with higher levels of expression in the fast contracting fibers.

8) Ingestion of protein or sucrose alone does not influence the regulation of leptin receptors, but whey protein could partially attenuate the leptin signaling cascade in response to a severe energy deficit.

9) PTP1B expression in skeletal muscle is up-regulated in response to a severe energy deficit, attenuating the activation of the leptin signaling cascade.

10) The COSMED K5 metabolic cart is highly reliable, even during uninterrupted operation for two hours.

11) The data collected demonstrate that it would be possible to develop a health tourism product by offering an exercise program and a low-calorie diet to produce a clinically relevant weight loss in less than a week.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Son necesarios experimentos con animales transgénicos para poder determinar la importancia que tiene el sistema de señalización por leptina en el músculo esquelético para el metabolismo energético durante el déficit energético severo. Además, dada la amplia expresión de los receptores de leptina, sería interesante determinar, en futuros estudios, cómo el sistema de señalización de la leptina es regulado en respuesta al déficit energético severo en otros tejidos, particularmente en el sistema nervioso central.

Queda por determinar cuál es la proporción óptima de proteínas e hidrato de carbono y la cantidad absoluta de proteínas mínima para lograr atenuar la pérdida de masa magra durante el déficit energético severo en seres humanos.

Son necesarios nuevos estudios para validar el metabolímetro K5 de COSMED, especialmente estudios en los que se usen sacos de Douglas para obtener medidas “gold standard”.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

- Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE (2002) Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. *Med Sci Sports Exerc* 34: 92-97
- Agus MS, Swain JF, Larson CL, Eckert EA, Ludwig DS (2000) Dietary composition and physiological adaptations to energy restriction. *Am J Clin Nutr* 71: 901-907
- Aloia JF, Vaswani A, Ma R, Flaster E (1995) To what extent is bone mass determined by fat-free or fat mass? *Am J Clin Nutr* 61: 1110-1114
- Alonso A, Fernandez R, Moreno M, Ordonez P, Diaz F, Gonzalez C (2007) Leptin and its receptor are controlled by 17beta-estradiol in peripheral tissues of ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 542-549
- Anderson JW, Konz EC, Frederich RC, Wood CL (2001) Long-term weight-loss maintenance: a meta-analysis of US studies. *Am J Clin Nutr* 74: 579-584
- Backx EM, Tieland M, Borgonjen-van den Berg KJ, Claessen PR, van Loon LJ, de Groot LC (2016) Protein intake and lean body mass preservation during energy intake restriction in overweight older adults. *Int J Obes (Lond)* 40: 299-304
- Bahr R (1992) Excess postexercise oxygen consumption--magnitude, mechanisms and practical implications. *Acta Physiol Scand Suppl* 605: 1-70
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275: 14563-14572
- Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 27: 4-25
- Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG, Jr. (2003) STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421: 856-859
- Ben-Dor M, Gopher A, Hershkovitz I, Barkai R (2011) Man the fat hunter: the demise of *Homo erectus* and the emergence of a new hominin lineage in the Middle Pleistocene (ca. 400 kyr) Levant. *PLoS ONE* 6: e28689
- Bjørnbæk C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG, Jr. (2000) SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 275: 40649-40657
- Bosy-Westphal A, Kossel E, Goele K, Later W, Hitze B, Settler U, Heller M, Gluer CC, Heymsfield SB, Muller MJ (2009) Contribution of individual organ mass loss to

weight loss-associated decline in resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr* 90: 993-1001

Bosy-Westphal A, Muller MJ (2014) Measuring the impact of weight cycling on body composition: a methodological challenge. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 17: 396-400

Breen L, Philp A, Witard OC, Jackman SR, Selby A, Smith K, Baar K, Tipton KD (2011) The influence of carbohydrate-protein co-ingestion following endurance exercise on myofibrillar and mitochondrial protein synthesis. *J Physiol* 589: 4011-4025

Brisswalter J, Tartaruga MP (2014) Comparison of COSMED'S FitMate and K4b2 metabolic systems reliability during graded cycling exercise. *Scand J Clin Lab Invest* 74: 722-724

Brochu M, Tchernof A, Turner AN, Ades PA, Poehlman ET (2003) Is there a threshold of visceral fat loss that improves the metabolic profile in obese postmenopausal women? *Metabolism* 52: 599-604

Buchwald H, Oien DM (2013) Metabolic/bariatric surgery worldwide 2011. *Obesity surgery* 23: 427-436

Cahill GF, Jr. (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* 26: 1-22

Calbet JA, Moysi JS, Dorado C, Rodriguez LP (1998) Bone mineral content and density in professional tennis players. *Calcif Tissue Int* 62: 491-496

Calbet JA, Ponce-Gonzalez JG, Perez-Suarez I, de la Calle Herrero J, Holmberg HC (2015) A time-efficient reduction of fat mass in 4 days with exercise and caloric restriction. *Scand J Med Sci Sports* 25: 223-233

Calbet JAL, Ponce-González JG, de La Calle-Herrero J, Pérez-Suárez I, Martín-Rincon M, Santana A, Morales-Alamo D, Holmberg HC (2017) Exercise preserves lean mass and performance during severe energy deficit: the role of exercise volume and dietary protein content. *Front Physiol* (In Press)

Carbone JW, McClung JP, Pasiakos SM (2012) Skeletal muscle responses to negative energy balance: effects of dietary protein. *Adv Nutr* 3: 119-126

Carlomagno D, Bosio A, Morelli A, Tornaghi M, Induni M, Rampinini E (2015) Agreement between Vmax29 and the new breath-by-breath respiratory system Vyntus cpx during maximal incremental exercise. In: Radmann A, Hedenborg S, Tsolakidis E (eds) *Book of Abstracts of the 20th Annual Congress of the European College of Sport Science*. European College of Sport Science, Malmo, Sweden, p. 597

Carlson LA, Fröberg SO (1967) Blood lipid and glucose levels during a ten-day period of low-calorie intake and exercise in man. *Metabolism* 16: 624-634

- Carter J, Jeukendrup AE (2002) Validity and reliability of three commercially available breath-by-breath respiratory systems. *Eur J Appl Physiol* 86: 435-441
- Cava E, Yeat NC, Mittendorfer B (2017) Preserving Healthy Muscle during Weight Loss. *Adv Nutr* 8: 511-519
- Chaston TB, Dixon JB, O'Brien PE (2007) Changes in fat-free mass during significant weight loss: a systematic review. *Int J Obes (Lond)* 31: 743-750
- Chen YW, Gregory CM, Scarborough MT, Shi R, Walter GA, Vandeborn K (2007) Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. *Physiol Genomics* 31: 510-520
- Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, Tremblay ML (2002) Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2: 497-503
- Compher C, Frankenfield D, Keim N, Roth-Yousey L, Evidence Analysis Working G (2006) Best practice methods to apply to measurement of resting metabolic rate in adults: a systematic review. *J Am Diet Assoc* 106: 881-903
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295
- Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P (2003) International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* 35: 1381-1395
- Culley L, Hudson N, Rapport F, Blyth E, Norton W, Pacey AA (2011) Crossing borders for fertility treatment: motivations, destinations and outcomes of UK fertility travellers. *Human reproduction (Oxford, England)* 26: 2373-2381
- Darter BJ, Rodriguez KM, Wilken JM (2013) Test-retest reliability and minimum detectable change using the K4b2: oxygen consumption, gait efficiency, and heart rate for healthy adults during submaximal walking. *Res Q Exerc Sport* 84: 223-231
- Duffield R, Dawson B, Pinnington HC, Wong P (2004) Accuracy and reliability of a Cosmed K4b2 portable gas analysis system. *J Sci Med Sport* 7: 11-22
- Dulloo AG, Jacquet J, Girardier L (1996) Autoregulation of body composition during weight recovery in human: the Minnesota Experiment revisited. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 393-405

- Eguchi M, Gillis LC, Liu Y, Lyakhovskiy N, Du M, McDermott JC, Sweeney G (2007) Regulation of SOCS-3 expression by leptin and its co-localization with insulin receptor in rat skeletal muscle cells. *Mol Cell Endocrinol* 267: 38-45
- Farnsworth E, Luscombe ND, Noakes M, Wittert G, Argyiou E, Clifton PM (2003) Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. *Am J Clin Nutr* 78: 31-39
- Foss O, Hallen J (2005) Validity and stability of a computerized metabolic system with mixing chamber. *Int J Sports Med* 26: 569-575
- Friedman J (2016) The long road to leptin. *J Clin Invest* 126: 4727-4734
- Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770
- Fuentes T, Ara I, Guadalupe-Grau A, Larsen S, Stallknecht B, Olmedillas H, Santana A, Helge JW, Calbet JA, Guerra B (2010) Leptin receptor 170 kDa (OB-R170) protein expression is reduced in obese human skeletal muscle: a potential mechanism of leptin resistance. *Exp Physiol* 95: 160-171
- Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, Russo A, Sulkowski S, Surmacz E (2006) Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res* 12: 1447-1453
- Garrow JS, Summerbell CD (1995) Meta-analysis: effect of exercise, with or without dieting, on the body composition of overweight subjects. *Eur J Clin Nutr* 49: 1-10
- Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Garcia L, Torres-Peralta R, Morales-Alamo D, Ponce-Gonzalez JG, Perez-Suarez I, Santana A, Calbet JA (2016) Greater basal skeletal muscle AMPK α phosphorylation in men than in women: Associations with anaerobic performance. *European journal of sport science* 16: 455-464
- Guerra B, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Guadalupe-Grau A, Olmedillas H, Santana A, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, Calbet JA (2008) Gender dimorphism in skeletal muscle leptin receptors, serum leptin and insulin sensitivity. *PLoS ONE* 3: e3466
- Guerra B, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Fuentes T, Chapinal E, Fernandez-Perez L, De Pablos-Velasco P, Santana A, Calbet JA (2011) Is sprint exercise a leptin signaling mimetic in human skeletal muscle? *J Appl Physiol* 111: 715-725
- Guerra B, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Guadalupe-Grau A, Kiilerich K, Fuentes T, Ringholm S, Bienso RS, Santana A, Lundby C, Pilegaard H, Calbet JA (2014) Leptin signaling in skeletal muscle after bed rest in healthy humans. *Eur J Appl Physiol* 114: 345-357

- Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C, Calbet JA (2007) Leptin receptors in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 1786-1792
- Hanefeld J, Smith R, Horsfall D, Lunt N (2014) What Do We Know About Medical Tourism? A Review of the Literature With Discussion of Its Implications for the UK National Health Service as an Example of a Public Health Care System. *Journal of Travel Medicine* 21: 410-417
- Hikita M, Bujo H, Hirayama S, Takahashi K, Morisaki N, Saito Y (2000) Differential regulation of leptin receptor expression by insulin and leptin in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 703-709
- Howe CC, Matzko RO, Piaser F, Pitsiladis YP, Easton C (2014) Stability of the K4b(2) portable metabolic analyser during rest, walking and running. *J Sports Sci* 32: 157-163
- Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H (2004) Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 4325-4331
- Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M (2007) Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia* 39: 22-27
- Janssen I, Fortier A, Hudson R, Ross R (2002) Effects of an energy-restrictive diet with or without exercise on abdominal fat, intermuscular fat, and metabolic risk factors in obese women. *Diabetes Care* 25: 431-438
- Janssen I, Ross R (1999) Effects of sex on the change in visceral, subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in response to weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 1035-1046
- Johannsen DL, Knuth ND, Huizenga R, Rood JC, Ravussin E, Hall KD (2012) Metabolic slowing with massive weight loss despite preservation of fat-free mass. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 2489-2496
- Johnson MJ, Friedl KE, Frykman PN, Moore RJ (1994) Loss of muscle mass is poorly reflected in grip strength performance in healthy young men. *Med Sci Sports Exerc* 26: 235-240
- Johnston CS, Tjonn SL, Swan PD (2004) High-protein, low-fat diets are effective for weight loss and favorably alter biomarkers in healthy adults. *J Nutr* 134: 586-591
- Kimber NE, Ross JJ, Mason SL, Speedy DB (2002) Energy balance during an ironman triathlon in male and female triathletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 12: 47-62
- Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM (2010) Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS ONE* 5: e11376

- Knobelspies H, Zeidler J, Hekerman P, Bamberg-Lemper S, Becker W (2010) Mechanism of attenuation of leptin signaling under chronic ligand stimulation. *BMC biochemistry* 11: 2
- Kraschnewski JL, Boan J, Esposito J, Sherwood NE, Lehman EB, Kephart DK, Sciamanna CN (2010) Long-term weight loss maintenance in the United States. *Int J Obes (Lond)* 34: 1644-1654
- Krieger JW, Sitren HS, Daniels MJ, Langkamp-Henken B (2006) Effects of variation in protein and carbohydrate intake on body mass and composition during energy restriction: a meta-regression. *Am J Clin Nutr* 83: 260-274
- Lam NT, Lewis JT, Cheung AT, Luk CT, Tse J, Wang J, Bryer-Ash M, Kolls JK, Kieffer TJ (2004) Leptin increases hepatic insulin sensitivity and protein tyrosine phosphatase 1B expression. *Mol Endocrinol* 18: 1333-1345
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635
- Legido-Quigley H, Passarani I, Knai C, Busse R, Palm W, Wismar M, McKee M (2011) Cross-border healthcare in the European Union: clarifying patients' rights. *BMJ* 342: d296
- Lepretre PM, Weissland T, Paton C, Jeanne M, Delannaud S, Ahmaidi S (2012) Comparison of 2 portable respiratory gas analysers. *Int J Sports Med* 33: 728-733
- Li Z, Zhou Y, Carter-Su C, Myers MG, Jr., Rui L (2007) SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Mol Endocrinol* 21: 2270-2281
- Longland TM, Oikawa SY, Mitchell CJ, Devries MC, Phillips SM (2016) Higher compared with lower dietary protein during an energy deficit combined with intense exercise promotes greater lean mass gain and fat mass loss: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 103: 738-746
- Lu Z, Xie J, Wu G, Shen J, Collins R, Chen W, Kang X, Luo M, Zou Y, Huang LJ, Amatruda JF, Slone T, Winick N, Scherer PE, Zhang CC (2017) Fasting selectively blocks development of acute lymphoblastic leukemia via leptin-receptor upregulation. *Nat Med* 23: 79-90
- Lunt N, Carrera P (2010) Medical tourism: assessing the evidence on treatment abroad. *Maturitas* 66: 27-32
- Lunt N, Horsfall D, Hanefeld J (2016) Medical tourism: A snapshot of evidence on treatment abroad. *Maturitas* 88: 37-44

- Magkos F, Fraterrigo G, Yoshino J, Luecking C, Kirbach K, Kelly SC, de Las Fuentes L, He S, Okunade AL, Patterson BW, Klein S (2016) Effects of Moderate and Subsequent Progressive Weight Loss on Metabolic Function and Adipose Tissue Biology in Humans with Obesity. *Cell Metab* 23: 591-601
- Mao X, Zeng X, Huang Z, Wang J, Qiao S (2013) Leptin and leucine synergistically regulate protein metabolism in C2C12 myotubes and mouse skeletal muscles. *Br J Nutr* 110: 256-264
- Marks BL, Rippe JM (1996) The importance of fat free mass maintenance in weight loss programmes. *Sports Med* 22: 273-281
- Marniemi J, Vuori I, Kinnunen V, Rahkila P, Vainikka M, Peltonen P (1984) Metabolic changes induced by combined prolonged exercise and low-calorie intake in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 53: 121-127
- Mars M, de Graaf C, de Groot CP, van Rossum CT, Kok FJ (2006) Fasting leptin and appetite responses induced by a 4-day 65%-energy-restricted diet. *Int J Obes (Lond)* 30: 122-128
- Mettler S, Mitchell N, Tipton KD (2010) Increased protein intake reduces lean body mass loss during weight loss in athletes. *Med Sci Sports Exerc* 42: 326-337
- Miller WC, Koceja DM, Hamilton EJ (1997) A meta-analysis of the past 25 years of weight loss research using diet, exercise or diet plus exercise intervention. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21: 941-947
- Millward DJ, Truby H, Fox KR, Livingstone MB, Macdonald IA, Tothill P (2014) Sex differences in the composition of weight gain and loss in overweight and obese adults. *Br J Nutr* 111: 933-943
- Mittendorfer B, Klein S (2001) Effect of aging on glucose and lipid metabolism during endurance exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 11 Suppl: S86-91
- MohammadTaghvaei N, Taheripak G, Taghikhani M, Meshkani R (2012) Palmitate-induced PTP1B expression is mediated by ceramide-JNK and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation. *Cell Signal* 24: 1964-1970
- Morales-Alamo D, Ponce-Gonzalez JG, Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Garcia L, Santana A, Cusso R, Guerrero M, Dorado C, Guerra B, Calbet JA (2013) Critical role for free radicals on sprint exercise-induced CaMKII and AMPKalpha phosphorylation in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 114: 566-577
- Muller MJ, Bosy-Westphal A, Kutzner D, Heller M (2002) Metabolically active components of fat-free mass and resting energy expenditure in humans: recent lessons from imaging technologies. *Obes Rev* 3: 113-122

- Myers MG, Jr., Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW (2010) Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab* 21: 643-651
- Obanda DN, Cefalu WT (2013) Modulation of cellular insulin signaling and PTP1B effects by lipid metabolites in skeletal muscle cells. *J Nutr Biochem* 24: 1529-1537
- Olmedillas H, Guerra B, Guadalupe-Grau A, Santana A, Fuentes T, Dorado C, Serrano-Sanchez JA, Calbet JA (2011) Training, leptin receptors and SOCS3 in human muscle. *Int J Sports Med* 32: 319-326
- Olmedillas H, Sanchis-Moysi J, Fuentes T, Guadalupe-Grau A, Ponce-Gonzalez JG, Morales-Alamo D, Santana A, Dorado C, Calbet JA, Guerra B (2010) Muscle hypertrophy and increased expression of leptin receptors in the musculus triceps brachii of the dominant arm in professional tennis players. *Eur J Appl Physiol* 108: 749-758
- Opstad PK (2001) Endocrine and Metabolic Changes during Exhaustive Multifactorial Military Stress. Results from Studies during the Ranger Training Course of the Norwegian Military Academy. The Effect of Prolonged Military Activities in Man Physiological and Biochemical Changes Possible Means of Rapid Recuperation RTO MEETING PROCEEDINGS 42. RTO/NATO
- Pasiakos SM, Cao JJ, Margolis LM, Sauter ER, Whigham LD, McClung JP, Rood JC, Carbone JW, Combs GF, Jr., Young AJ (2013) Effects of high-protein diets on fat-free mass and muscle protein synthesis following weight loss: a randomized controlled trial. *FASEB J* 27: 3837-3847
- Pennings B, Boirie Y, Senden JM, Gijsen AP, Kuipers H, van Loon LJ (2011) Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am J Clin Nutr* 93: 997-1005
- Phillips SM (2011) The science of muscle hypertrophy: making dietary protein count. *Proc Nutr Soc* 70: 100-103
- Ponce-Gonzalez JG, Rodriguez-Garcia L, Losa-Reyna J, Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Diaz-Chico BN, Dorado C, Serrano-Sanchez JA, Calbet JA (2016) Androgen receptor gene polymorphisms influence fat accumulation: A longitudinal study from adolescence to adult age. *Scand J Med Sci Sports* 26: 1313-1320
- Popov D, Nemezc M, Dumitrescu M, Georgescu A, Bohmer FD (2009) Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 51-55
- Qian Y, Shi D, Qiu J, Zhu F, Qian J, He S, Shu Y, Yin Y, Chen X (2015) ObRb downregulation increases breast cancer cell sensitivity to tamoxifen. *Tumour Biol* 36: 6813-6821

- Rice B, Janssen I, Hudson R, Ross R (1999) Effects of aerobic or resistance exercise and/or diet on glucose tolerance and plasma insulin levels in obese men. *Diabetes Care* 22: 684-691
- Ross R, Dagnone D, Jones PJ, Smith H, Paddags A, Hudson R, Janssen I (2000) Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 133: 92-103
- Ryan AS, Harduarsingh-Permaul AS (2014) Effects of weight loss and exercise on trunk muscle composition in older women. *Clinical interventions in aging* 9: 395-402
- Santanasto AJ, Glynn NW, Newman MA, Taylor CA, Brooks MM, Goodpaster BH, Newman AB (2011) Impact of weight loss on physical function with changes in strength, muscle mass, and muscle fat infiltration in overweight to moderately obese older adults: a randomized clinical trial. *J Obes* 2011
- Sartorio A, Maffiuletti NA, Agosti F, Lafortuna CL (2005) Gender-related changes in body composition, muscle strength and power output after a short-term multidisciplinary weight loss intervention in morbid obesity. *J Endocrinol Invest* 28: 494-501
- Schrack JA, Simonsick EM, Ferrucci L (2010) Comparison of the Cosmed K4b(2) portable metabolic system in measuring steady-state walking energy expenditure. *PLoS ONE* 5: e9292
- Serrano-Sanchez JA, Delgado-Guerra S, Olmedillas H, Guadalupe-Grau A, Arteaga-Ortiz R, Sanchis-Moysi J, Dorado C, Calbet JA (2010) Adiposity and age explain most of the association between physical activity and fitness in physically active men. *PLoS ONE* 5: e13435
- Shaw K, Gennat H, O'Rourke P, Del Mar C (2009) Exercise for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003817
- Shaw RJ (2009) LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 65-80
- Shpilberg O, Burstein R, Epstein Y, Suessholz A, Getter R, Rubinstein A (1990) Lipid profile in trained subjects undergoing complete food deprivation combined with prolonged intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 60: 305-308
- Sjostrom L (2013) Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med* 273: 219-234
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85

- Snijders T, Res PT, Smeets JS, van Vliet S, van Kranenburg J, Maase K, Kies AK, Verdijk LB, van Loon LJ (2015) Protein Ingestion before Sleep Increases Muscle Mass and Strength Gains during Prolonged Resistance-Type Exercise Training in Healthy Young Men. *J Nutr* 145: 1178-1184
- Spaeth AM, Dinges DF, Goel N (2015) Resting metabolic rate varies by race and by sleep duration. *Obesity (Silver Spring)* 23: 2349-2356
- St-Pierre J, Tremblay ML (2012) Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases. *Cell Metab* 15: 292-297
- Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ (2002) Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E187-192
- Stull AJ, Wang ZQ, Zhang XH, Yu Y, Johnson WD, Cefalu WT (2012) Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase 1B regulates insulin sensitivity in African Americans. *Diabetes* 61: 1415-1422
- Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM (2009) Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* 107: 987-992
- Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 6093-6096
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271
- Uddin S, Bavi P, Siraj AK, Ahmed M, Al-Rasheed M, Hussain AR, Ahmed M, Amin T, Alzahrani A, Al-Dayel F, Abubaker J, Bu R, Al-Kuraya KS (2010) Leptin-R and its association with PI3K/AKT signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 17: 191-202
- Uddin S, Bu R, Ahmed M, Abubaker J, Al-Dayel F, Bavi P, Al-Kuraya KS (2009) Overexpression of leptin receptor predicts an unfavorable outcome in Middle Eastern ovarian cancer. *Mol Cancer* 8: 74
- Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Dorado C, Calbet JA (2005) Muscular development and physical activity as major determinants of femoral bone mass acquisition during growth. *Br J Sports Med* 39: 611-616
- VilSBoll T, Christensen M, Junker AE, Knop FK, Gluud LL (2012) Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on weight loss: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 344: d7771

- Vogels N, Westerterp-Plantenga MS (2007) Successful long-term weight maintenance: a 2-year follow-up. *Obesity (Silver Spring)* 15: 1258-1266
- Weiss EP, Racette SB, Villareal DT, Fontana L, Steger-May K, Schechtman KB, Klein S, Ehsani AA, Holloszy JO, Washington University School of Medicine CG (2007) Lower extremity muscle size and strength and aerobic capacity decrease with caloric restriction but not with exercise-induced weight loss. *J Appl Physiol* (1985) 102: 634-640
- Willis LH, Slentz CA, Bateman LA, Shields AT, Piner LW, Bales CW, Houmard JA, Kraus WE (2012) Effects of aerobic and/or resistance training on body mass and fat mass in overweight or obese adults. *J Appl Physiol* 113: 1831-1837
- Wolsk E, Mygind H, Grondahl TS, Pedersen BK, van Hall G (2011) The role of leptin in human lipid and glucose metabolism: the effects of acute recombinant human leptin infusion in young healthy males. *Am J Clin Nutr* 94: 1533-1544
- Yang Y, Breen L, Burd NA, Hector AJ, Churchward-Venne TA, Josse AR, Tarnopolsky MA, Phillips SM (2012) Resistance exercise enhances myofibrillar protein synthesis with graded intakes of whey protein in older men. *Br J Nutr* 108: 1780-1788
- Yuan XW, Han SF, Zhang JW, Xu JY, Qin LQ (2015) Leucine supplementation improves leptin sensitivity in high-fat diet fed rats. *Food Nutr Res* 59: 27373
- Zabolotny JM, Haj FG, Kim YB, Kim HJ, Shulman GI, Kim JK, Neel BG, Kahn BB (2004) Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J Biol Chem* 279: 24844-24851
- Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB (2008) Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 283: 14230-14241
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432
- Zinner C, Morales-Alamo D, Ortenblad N, Larsen FJ, Schiffer TA, Willis SJ, Gelabert-Rebato M, Perez-Valera M, Boushel R, Calbet JA, Holmberg HC (2016) The Physiological Mechanisms of Performance Enhancement with Sprint Interval Training Differ between the Upper and Lower Extremities in Humans. *Front Physiol* 7: 426

