



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2021

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INGESTA DE
CAFEÍNA Y LA ACTIVIDAD FÍSICA SOBRE EL ESTADO
INFLAMATORIO DEL ORGANISMO**

Lluís Antoni Rodas Cañellas



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2021

**Programa de Doctorado en Investigación Translacional
en Salud Pública y Enfermedades de Alta Prevalencia**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INGESTA DE
CAFÉINA Y LA ACTIVIDAD FÍSICA SOBRE EL ESTADO
INFLAMATORIO DEL ORGANISMO**

Lluís Antoni Rodas Cañellas

Director: Pedro Tauler Riera

Directora: Sonia Martínez Andreu

Tutor: Pedro Tauler Riera

Doctor por la Universitat de les Illes Balears

Listado de publicaciones derivadas de la tesis

Los dos artículos publicados que forman parte de esta tesis comparten la misma línea de investigación, centrada en el estudio de cómo afecta el consumo de cafeína al estado inflamatorio del organismo en población sana. A continuación, se presentan las referencias completas de las publicaciones derivadas de la tesis, así como los indicios de calidad de las revistas donde están publicados los artículos:

Artículo I **Rodas, Ll.**, Riera-Sampol, A., Aguiló, A., Martínez, S., Tauler, P. (2020). Effects of Habitual Caffeine Intake, Physical Activity Levels, and Sedentary Behavior on the Inflammatory Status in a Healthy Population. *Nutrients*, 12 (8): 2325. DOI: 10.3390/nu12082325.

Factor de impacto (2020): 5,717 (17/88; Q1; Área "Nutrition & Dietetics").

Artículo II **Rodas, Ll.**, Martínez, S., Aguiló, A., Tauler, P. (2020). Caffeine supplementation induces higher IL-6 and IL-10 plasma levels in response to a treadmill exercise test. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 17 (1): 47. DOI: 10.1186/s12970-020-00375-4.

Factor de impacto (2020): 5,150 (9/88; Q1; Área "Sport Sciences").

“Si te encuentras con la victoria o la derrota,
trátalas como el mismo impostor”
Rudyard Kipling

Papà i Mamà

Agradecimientos

Les primeres paraules d'agraïment són pel tutor i director de tesi, el Dr. Pedro Tauler, amb qui des que vàrem coincidir al tercer curs de Grau amb l'assignatura de "Bioquímica de l'Activitat Física" m'ha donat l'oportunitat d'iniciar un camí científic, primer sent tutor del treball de fi de grau i ara, guiant-me durant el doctorat. Gràcies. A la Dra. Sonia Martínez, directora de tesi amb qui he compartit hores de laboratori durant els estudis i figura clau en el difícil procés de revisió del document final.

A la resta del grup d'Evidència, Estils de Vida i Salut: Dr. Antoni Aguiló, Aina Riera i Leticia Lozano ja que de cadascun d'ells he après el que és el treball en equip dins un grup d'investigació, sempre dins un ambient molt agradable. Desitj poder tornar coincidir en un futur.

Al Ministeri d'Economia, Industria i Competitivitat (MINECO) pel finançament del projecte DEP2013-45966-P (MINECO/AEI/ERDF, EU) que ha permès el desenvolupament de la present tesi, així com a la Universitat de les Illes Balears pels anys de formació.

A Marga Munar, amiga, parella i companya de vida, pel suport rebut durant els anys d'escriptura del present document. Perquè "just quan intentes recordar en quin moment va començar tot, descobreixes que tot va començar abans del que pensaves".

Als meus pares, Luis i M^a Rosa, per l'educació i els valors que ens han donat tant al meu germà com a jo, i per donar-me suport en tot el que m'he proposat.

Al meu germà Albert, per compartir infantesa, escola, clubs de natació, triatló, "pertidos" i lloc de feina. Vist així, no som tan diferents. Igualment, a la meva cunyada, Marina. Me deus una partida de jocs de taula...

Als avis, abuelos i titas, ja que, tot i que els hi va ser difícil aprendre el nom de la carrera que estudiava, sempre s'han preocupat per entendre què és el que he fet aquests anys. A la Mima, Parrí i Aina, així com a les cosines Rosa i Noa. Sense poder oblidar-me d'en Miquel.

A nen Roig. Qui va estudiar amb jo, tombat damunt l'escriptori de casa dels meus pares, tot el curs de 2n de batxillerat, selectivitat i la carrera.

A la família d'Alaró, Toni i Jero i als padrins, per fer-me sentir com a casa.

A tots els professors i professores del Col·legi Sant Francesc de Palma, per ser la segona casa durant 14 anys i per tot l'aprenentatge que vaig rebre. Sens dubte, els millors anys.

Al amics de tota la vida i per tota la vida. Joan Ramis, Pere Llinàs, Joan Miquel Pujol, Toni Marqués, Alejandro Arce, Carlos Darder, Joan Domingo i Lida Frau. Uns per els anys d'escola, altres per anys d'universitat. Perquè els vertaders amics són aquells que, tot i veure menys del que t'agradaria, cada vegada que coincideixes amb ells és com si el temps no hagués passat.

A la natació i al triatló, per ser no només una via d'esplai, sinó per ser un model de vida. I al Club Natació La Salle, perquè sense la seva oportunitat mai hagués pogut dedicar el temps necessari per poder completar la tesi.

Índice

Resumen.....	15
Resum	17
Abstract	19
Relación de acrónimos, siglas y abreviaturas.....	21
Estructura de la tesis	23
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	25
1.1 Cafeína.....	25
1.1.1 Consumo y fuentes de cafeína.....	25
1.1.2 Absorción, metabolismo y excreción de la cafeína	27
1.1.3 Mecanismos de acción de la cafeína	29
1.1.4 Efectos generales de la cafeína en el organismo	33
1.1.5 Cafeína y actividad física	36
1.2 Actividad física e inflamación sistémica crónica de bajo nivel	41
1.2.1 Inflamación sistémica crónica de bajo nivel.....	41
1.2.2 Relación entre la actividad física y la inflamación sistémica crónica de bajo nivel.....	47
1.2.3 Sedentarismo como causa directa de la inflamación crónica de bajo nivel ..	49
1.3 Respuesta inmunológica e inflamatoria a una sesión de actividad física	50
1.3.1 Respuesta inmunitaria a una sesión de actividad física.....	50
1.3.2 Respuesta de la IL-6 a una sesión de ejercicio: causas y efectos	53
1.3.3 Respuesta de la IL-10 a una sesión de ejercicio.....	57
1.3.4 Respuesta de otras citocinas a una sesión de ejercicio.....	58
1.3.5 Producción estimulada de citocinas <i>in vitro</i> en relación con el ejercicio	59
1.4 Cafeína e inflamación	61
1.4.1 Mecanismos implicados en el efecto de la cafeína sobre la inflamación	61
1.4.2 Efectos de la cafeína sobre el estado inflamatorio del organismo	64
1.4.3 Cafeína y respuesta inflamatoria a una sesión de ejercicio	65
1.4.4 Relación entre café, inflamación y salud	67
1.4.4.1. Ácidos clorogénicos.....	68
1.4.4.2. Ingesta de café y estado inflamatorio del organismo	71
1.4.4.3 Café y salud	74
Capítulo 2: OBJETIVOS	79
Capítulo 3: HIPÓTESIS	81
Capítulo 4: RESULTADOS	83
Artículo I.....	83

Artículo II.....	109
Capítulo 5: DISCUSIÓN	135
Capítulo 6: LIMITACIONES DE LA TESIS.....	145
Capítulo 7: CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA.....	149
ANEXOS	163
Anexo 1: Resolución del comité de ética	163
Anexo 2: Cuaderno de recogida de datos para el estudio A	164
Anexo 3: Cuaderno de recogida de datos para el estudio B	176

Resumen

Debido a su presencia en productos como el café o el té, la cafeína es, probablemente, el producto farmacológico más consumido por el ser humano. Resultados de estudios previos demuestran un posible efecto antiinflamatorio, así como un efecto saludable, bien por la propia cafeína o por los ácidos clorogénicos presentes en el café. Por otra parte, la actividad física, tanto puntual como llevada a cabo de forma continuada, se ha relacionado con un efecto antiinflamatorio. Sin embargo, no se han estudiado en profundidad los efectos combinados de la actividad física y la ingesta de cafeína sobre la respuesta inflamatoria en el organismo.

El objetivo general de la tesis fue determinar el efecto de la actividad física en combinación con la ingesta de cafeína sobre el estado inflamatorio del organismo.

Para cumplir este objetivo se siguió un diseño experimental basado en dos estudios. Por una parte, se realizó un estudio transversal observacional con 244 participantes sanos (112 hombres y 132 mujeres) para determinar la asociación entre los marcadores de inflamación, el nivel de actividad física y de sedentarismo, y la ingesta habitual de cafeína, además de variables de control como el nivel de grasa visceral y total en el organismo. En el caso del consumo habitual de cafeína, solo se observó una asociación negativa con los niveles plasmáticos de proteína C reactiva (PCR) ($p=0.001$). En cuanto al porcentaje de grasa corporal, éste se asoció positivamente con los niveles de PCR ($p<0.001$) e inversamente con los de adiponectina ($p=0.032$) e IL-10 ($p=0.001$), mientras que, el nivel de grasa visceral era el principal predictor de la IL-6 ($p<0.001$) y el TNF α ($p<0.001$). Por otro lado, el comportamiento sedentario fue el principal predictor, negativo, de la concentración de IL-10 ($p<0.001$), y positivo de la concentración de TNF α ($p<0.001$).

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio de intervención cruzado, doble ciego y aleatorizado de suplementación con cafeína (6 mg/kg peso corporal) antes de la realización de un ejercicio en un tapiz rodante (60 minutos, 70%VO $_2$ máx). En este caso, los participantes fueron 13 deportistas recreacionales varones bien entrenados. La suplementación con cafeína provocó concentraciones superiores de IL-10 (2.42 ± 0.54 vs. 3.47 ± 0.72 pg·mL $^{-1}$, $p=0.01$) y de IL-6 (3.04 ± 0.40 vs. 3.89 ± 0.62 pg·mL $^{-1}$, $p=0.003$) en respuesta al ejercicio. Además, la suplementación con cafeína indujo concentraciones superiores de adrenalina (257.3 ± 53.2 vs. 134.0 ± 25.7 pg·mL $^{-1}$, $p=0.03$) después del ejercicio, así como de cortisol (46.4 ± 8.5 vs. 32.3 ± 5.6 pg·mL $^{-1}$, $p=0.007$) dos horas después de haber finalizado el ejercicio.

En conclusión, en la población estudiada, tanto la actividad física como la ingesta habitual de cafeína se asociaron con un efecto antiinflamatorio muy ligero, caracterizado, respectivamente, por niveles superiores de IL-10 e inferiores de PCR. Por el contrario, el sedentarismo y el acúmulo de grasa se revelaron como los principales determinantes del estado proinflamatorio del organismo. Sin embargo, la suplementación con cafeína aportó a la respuesta inflamatoria a una sesión de ejercicio un carácter más antiinflamatorio, definido, principalmente, por mayores incrementos de IL-10 en respuesta al ejercicio.

Resum

Per la seva presència en productes com el cafè o el te, la cafeïna és, probablement, el producte farmacològic més consumit per l'ésser humà. Resultats d'estudis previs demostren un possible efecte antiinflamatori de la cafeïna, així com un efecte saludable degut a la cafeïna mateixa o als àcids clorogènics propis del cafè. D'altra banda, l'activitat física, tant puntual com duta a terme de manera continuada, s'ha relacionat amb un efecte antiinflamatori. Tot i així, no s'han estudiat en profunditat els efectes combinats de l'activitat física i la ingesta de cafeïna sobre la resposta inflamatòria en l'organisme.

L'objectiu general de la tesi era determinar l'efecte de l'activitat física en combinació amb la ingesta de cafeïna sobre l'estat inflamatori de l'organisme.

Per assolir aquest objectiu, es va seguir un disseny experimental basat en dos estudis. Per una part, es va realitzar un estudi transversal observacional amb 244 participants sans (112 homes i 132 dones), per determinar l'associació entre els marcadors d'inflamació, nivells d'activitat física i de sedentarisme, i la ingesta habitual de cafeïna, a més de variables de control com els nivells de greix visceral i total en l'organisme. En el cas del consum habitual de cafeïna, només es va observar una associació negativa amb els nivells de proteïna C reactiva (PCR) ($p=0.001$). Quant al percentatge de greix corporal, aquest es va associar positivament amb els nivells de PCR ($p<0.001$) i negativament amb els d'adiponectina ($p=0.032$) i de IL-10 ($p=0.001$). El nivell de greix visceral es va determinar com el principal predictor de la IL-6 ($p<0.001$) i del TNF α ($p<0.001$). Finalment, el comportament sedentari fou el principal predictor, negatiu, de la concentració de IL-10 ($p<0.001$) i, positiu, de la concentració de TNF α ($p<0.001$).

En segon lloc, es va dur a terme un estudi d'intervenció creuat, amb cegament doble i aleatoritzat de suplementació amb cafeïna (6 mg/kg pes corporal) abans de la realització d'un exercici en cinta de córrer (60 minuts, 70% VO₂màx). En aquest cas, els participants foren 13 esportistes aficionats de sexe masculí ben entrenats. La suplementació amb cafeïna va provocar concentracions superiors de IL-10 (2.42 ± 0.54 vs. 3.47 ± 0.72 pg·mL⁻¹, $p=0.01$) i de IL-6 (3.04 ± 0.40 vs. 3.89 ± 0.62 pg·mL⁻¹, $p=0.003$) en resposta a l'exercici. A més, la suplementació amb cafeïna va induir concentracions superiors d'adrenalina (257.3 ± 53.2 vs. 134.0 ± 25.7 pg·mL⁻¹, $p=0.03$) després de l'exercici, així com de cortisol (46.4 ± 8.5 vs. 32.3 ± 5.6 pg·mL⁻¹, $p=0.007$) dues hores després d'haver finalitzat l'exercici.

En conclusió, en la població estudiada, tant l'activitat física com la ingesta habitual de cafeïna estaven associades a un efecte antiinflamatori molt lleuger, caracteritzat, respectivament, per nivells superiors de IL-10 i inferiors de PCR. Per contra, el sedentarisme i l'acumulació de greix es varen revelar com els principals determinants de l'estat proinflamatori de l'organisme. Per altra part, la suplementació amb cafeïna va aportar a la resposta inflamatòria en una sessió puntual d'exercici un caràcter més antiinflamatori, caracteritzat, principalment, per majors increments de IL-10 en resposta a l'exercici.

Abstract

Due to caffeine's widespread presence in foods such as coffee or tea, it is probably the most commonly consumed pharmacological product by humans. The results of previous studies show a possible anti-inflammatory effect and a beneficial impact on health either as a result of the caffeine itself or due to the chlorogenic acid present in coffee. For its part, physical activity of both an acute or a regular nature has been associated with an anti-inflammatory effect. However, the combined effects of physical activity and caffeine intake on the body's inflammatory response have not been determined.

The main aim of this thesis was to determine the effect of physical activity in combination with caffeine intake on the body's inflammatory state.

An experimental design based on two studies was applied to achieve this objective. First, a cross-sectional observational study with 244 healthy people (112 men and 132 women) was conducted to determine the association between inflammatory markers and the level of physical activity or sedentary behaviour and regular caffeine intake, in addition to other control variables, like the level of visceral and total body fat. In the case of regular caffeine intake, only a negative association with C-reactive protein (CRP) levels ($p=0.001$) was observed. The body fat percentage was positively associated with CRP levels ($p<0.001$) but negatively associated with adiponectin ($p=0.032$) and IL-10 ($p=0.001$). The visceral fat level was the main predictor for IL-6 ($p<0.001$) and TNF α ($p<0.001$). Sedentary behaviour was the main negative predictor for IL-10 ($p<0.001$) and main positive predictor for TNF α concentrations ($p<0.001$).

A randomized, double-blind crossover study was also conducted of supplementation with caffeine (6 mg/kg body mass) prior to a treadmill exercise test (60 minutes, 70% $VO_2\text{max}$). Thirteen well-trained recreational male athletes participated in the study. Caffeine supplementation produced higher plasma concentrations of IL-10 (2.42 ± 0.54 vs. 3.47 ± 0.72 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $p=0.01$) and IL-6 (3.04 ± 0.40 vs. 3.89 ± 0.62 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $p=0.003$) in response to exercise. Furthermore, caffeine supplementation induced higher adrenaline concentrations (257.3 ± 53.2 vs. 134.0 ± 25.7 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $p=0.03$) after exercise and higher cortisol levels (46.4 ± 8.5 vs. 32.3 ± 5.6 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $p=0.007$) after a 2-hour recovery period.

In conclusion, in the population under study, regular physical activity and caffeine intake were both only associated with a slight anti-inflammatory effect, characterized, respectively, by higher IL-10 and lower CRP levels. Sedentary habits and fat

accumulation were found to be the main predictors of a proinflammatory state. However, caffeine supplementation raised the anti-inflammatory response to an acute bout of exercise, mainly through higher IL-10 levels.

Relación de acrónimos, siglas y abreviaturas

5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo (AFMU)

Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ)

Ácidos clorogénicos (ACGs)

Adenosín monofosfato cíclico (AMPc)

Adenosín trifosfato (ATP)

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)

Agencia Mundial Antidopaje (AMA)

Angiotensina II (ANGII)

Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Citocromo P450 1A2 (CYP1A2)

Comité Olímpico Internacional (COI)

Constante de disociación (Kd)

Consumo máximo de oxígeno (VO₂máx)

Cuestionario de actividad física (IPAQ)

Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM 2)

Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (EHHA)

Equivalentes metabólicos (METs)

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

European Food Safety Authority (EFSA)

Factor de crecimiento transformante β (TGF β)

Factor de necrosis tumoral (TNF α)

Factor inducible por hipoxia 1 α (HIF 1 α)

Factor nuclear de IL-6 (NFIL6)

Factor nuclear kappa beta (NF-KB)

Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB)

Fosfoinositol 3 quinasa (PI3K)

Hidratos de carbono (HdC)

Hora (h)

Índice de masa corporal (IMC)

Interferón γ (IFN γ)

Interleucina (IL)

Lipopolisacárido (LPS)

Lipoproteína lipasa (LPL)

Malondialdehído (MDA)

Organización Mundial de la Salud (OMS)

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

Proteína C Reactiva (PCR)

Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)

Proteína quinasa B (Akt)

Proteína relacionada con la angiopoyetina2 (ANGPTL2)

Proteína secretada relacionada con el encrespamiento 5 (Sfrp5)

Receptor antagonista de interleucina 1 (IL-1ra)

Receptor de adenosina A_{2a} (ADORA2A)

Receptor de insulina (IRS)

Receptores tipo Toll (TLR)

Sesión de alta intensidad (HIIT)

Sistema nervioso central (SNC)

Supresor de citocinas-3 (SOC-3)

Tercera encuesta nacional de salud y nutrición (NHANESIII)

Transportador de glucosa 4 (GLUT4)

Estructura de la tesis

El primer capítulo consta de una introducción donde se profundizan los conceptos más relevantes de los estudios realizados. En primer lugar, se abordan las características que tiene la cafeína, tanto a nivel de consumo como sus mecanismos de acción y los efectos generales en el organismo, dado que la cafeína es un pilar básico en la presente tesis. En el siguiente apartado se explica qué es la inflamación sistémica crónica y su relación con distintas enfermedades, así como la manera en que repercuten los niveles de actividad física y el sedentarismo en dicho proceso inflamatorio. Seguidamente se tratan las respuestas inmunitarias e inflamatorias a una sesión de actividad física, incidiendo en cómo varían los niveles de IL-6 e IL-10, principalmente. Después se completan los mecanismos de la cafeína explicados en el primer apartado con su efecto sobre la inflamación. Finalmente se describen los efectos de la cafeína sobre el estado inflamatorio del organismo, primero sobre una sesión de ejercicio físico y después sobre cómo puede modificar los niveles de citocinas el consumo de café u otros componentes, como los ácidos clorogénicos.

En el segundo y tercer capítulo se exponen los objetivos y la hipótesis, respectivamente. Seguidamente, el capítulo cuatro es el de resultados, que presenta los dos artículos que componen la tesis.

El quinto capítulo es el de discusión, donde se argumentan y razonan los resultados del estudio, como también las limitaciones del estudio. Y en el capítulo siete se pueden consultar las conclusiones.

A continuación, pueden consultarse las referencias bibliográficas. Y al final aparecen los tres anexos donde se pueden consultar la resolución del comité de ética (anexo 1), el cuaderno de recogida de datos para el estudio A (anexo 2) y el cuaderno de recogida de datos para el estudio B (anexo 3). En estos cuadernos se pueden consultar los cuestionarios de actividad física (IPAQ), el consumo habitual de cafeína, el cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea, el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos y el registro dietético de una semana.

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Cafeína

La cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) pertenece a la familia de los compuestos heterocíclicos también llamados purinas. Su nombre sistemático es 3,7-dihidro-1,2,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona, aunque también es conocida como 1,3,7-trimetilxantina o 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina. Dicha sustancia está clasificada como un alcaloide, un término usado para aquellas sustancias que son producto final del metabolismo del nitrógeno de ciertas plantas, entre las que se encuentran las plantas del café, el té, el cacao y la cola [1].

1.1.1 Consumo y fuentes de cafeína

Debido a su efecto estimulante y su presencia en alimentos como el café, el té, el chocolate o algunas bebidas azucaradas, la cafeína es, probablemente, la sustancia psicoactiva más consumida en el mundo [2]. Los últimos datos disponibles confirman que cerca del 90% de estadounidenses consumen cafeína a diario [3, 4], en cantidades equivalentes a 2,8 mg/kg peso, observación que se mantiene en otros estudios llevados a cabo en Estados Unidos, que sitúan en 186 mg la cantidad media tomada por un adulto al día [4, 5], y siendo este valor inferior al observado en otros países como Brasil, donde se indica que la ingesta diaria es de 238 mg de cafeína [6]. La *European Food Safety Authority* (EFSA) [7] muestra como el consumo medio de cafeína por adulto en España en el año 2015, último año del que se conocen datos, era de 2,3 mg/kg peso (equivalente a 161 mg/día para un sujeto de 70 kg de peso), mientras que en países como Dinamarca superan los 10 mg/kg. De media, un café expreso contiene entre 75-100 mg de cafeína, por tanto, en un adulto de un peso medio de 70 kg, cada café expreso podría aportar 1 mg/kg peso. Referente a su toxicidad, se ha establecido que dosis entre 35-40 mg de cafeína/kg peso pueden resultar fatales [8].

En la naturaleza, la cafeína puede encontrarse en granos de café, hojas de té, granos de cacao o nueces de cola [1, 9]. Además, también puede ser producida sintéticamente para su uso como aditivo alimentario o como compuesto farmacéutico, teniendo una estructura idéntica a la que se encuentra en la naturaleza [10]. En el caso de las hojas de té, la cantidad de cafeína (comúnmente llamada teína) que encontramos en una hoja representa entre el 3-5% del total del peso seco [11, 12] y según datos de la EFSA corresponde a unos 40-50 mg de cafeína/taza.

De forma global, en África, el consumo de productos que contienen cafeína se centra en el té (principalmente té negro) y bebidas de cola. Lo mismo ocurre en los países asiáticos y del Pacífico, sobre todo en lugares como Japón, Vietnam y Hong Kong. En cambio, tanto en América del Norte como en Latinoamérica el aporte mayoritario es del café, seguido por las bebidas de cola [9]. Concretamente, en Estados Unidos, un 64% de la cafeína consumida a diario proviene del café, seguido del té, con un 16%. Las bebidas energéticas, que en el estudio en cuestión solo corresponden a un 1% del consumo de cafeína diario han tenido un repunte en la última década, según aseguran los autores [4], tal y como se comentará en los siguientes párrafos.

En los países europeos la ingesta mayoritaria de cafeína proviene del café, exceptuando en Gran Bretaña e Irlanda, donde la fuente principal es el té. En este sentido, en España, los estudios realizados muestran resultados dispares aunque con una observación común, que es que la mayor cantidad de cafeína en población adulta es ingerida en forma de café (entre el 40,5% y el 76,2%), dejando atrás otros productos como el té (20,7% y 0,7%) o las bebidas de cola (18,1% y 8,7%) [7]. En adolescentes (10-18 años), los datos de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y de la Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB) indican que casi no hay diferencias entre consumo de café (41,1 %) y chocolate (41,9%), aunque otros dos estudios [13, 14] muestran una tendencia mucho más polarizada hacia el consumo de chocolate. Según el estudio realizado por NUT INK05 [13] el consumo de café en adolescentes se sitúa en el 17,4% mientras que según el estudio enKid [14] apenas es del 8,2%. Por otro lado, el consumo de chocolate está en el 64,5% y 91,8%, respectivamente [7].

Otra de las fuentes habituales de cafeína son las bebidas para deportistas, caracterizadas por ser una fuente importante de hidratos de carbono (HdC) y/o electrolitos que conforman un preparado con dosis razonables de cafeína. Este tipo de productos deben ser diferenciados de aquellos que, a menudo, van dirigidos a deportistas con denominaciones tipo “bebidas energéticas o estimulantes” pero que contienen cantidades abusivas de cafeína (50-500 mg) [7] y que pueden suponer un riesgo para la salud. Éstas, cuyo consumo no supone más del 1% en población general [4], como se ha indicado anteriormente, tienen una tendencia en aumento en los últimos años, principalmente en población joven (entre el 30-50% de los adolescentes las consumen a diario) [15].

En los últimos años diversos estudios sugieren que la ingesta de café produce efectos beneficiosos para la salud [16-18]. En este sentido, se ha relacionado el consumo de café con una disminución del riesgo de sufrir enfermedades crónicas

severas. Sin embargo, considerando el contenido en cafeína, un consumo elevado puede ser contraproducente, sobre todo en mujeres embarazadas [19-21]. En este caso, se recomiendan dosis máximas entre 200-300 mg de cafeína al día (entre 3 y 4 mg/kg de peso) [4, 19, 20, 22], ya que la vida media es mayor que en mujeres no embarazadas, debido a una interacción entre la cafeína y los estrógenos, dando lugar a la inhibición de la síntesis de enzimas codificados por el gen citocromo P450 1A2 (CYP1A2), uno de los implicados en el metabolismo de la cafeína [7, 19, 20]. El hecho de disponer de mayores niveles de cafeína en el organismo de los recomendados, puede suponer un riesgo añadido para el feto dada la capacidad que tiene la cafeína de atravesar libremente la placenta [7]. Por esta razón, en países como Nueva Zelanda, Chile o Canadá marcan la dosis límite en 300 mg diarios de cafeína [4, 9]. Considerando población adulta sana con un peso de 70 kg, pese a observarse una reducción de la duración del sueño a partir de un consumo de 100 mg diarios de cafeína (1,4 mg/kg) [7], estas ingestas no se han asociado con otros efectos negativos que puedan suponer un riesgo para la salud, incluso un consumo de 400 mg (5,7 mg/kg) diarios tampoco parece aumentar la probabilidad de padecer algún efecto adverso sobre la salud [7, 9]. En cualquier caso, estos valores de 400 mg diarios parecen ser superiores al consumo habitual en muchos países. Por ejemplo, se ha establecido que un 14% de la población adulta de los Estados Unidos excede dicho umbral [4] y una tercera parte de los países estudiados por la EFSA superan esta dosis diariamente [7].

1.1.2 Absorción, metabolismo y excreción de la cafeína

Una vez ingerida, la cafeína se absorbe rápidamente en el intestino delgado, habiéndose observado que en unos 30-60 minutos después de haberla tomado los niveles en plasma ya se encuentran en valores máximos, manteniéndose bastante estables (por encima del 90% del nivel máximo) durante las cuatro horas siguientes [23]. En cualquier caso, la cafeína puede encontrarse en el organismo hasta 9-10 horas (h) después de su ingesta, ya que su metabolización es considerablemente lenta [23], ocurriendo en el hígado hasta su excreción vía urinaria [10]. En cuanto al valor de la concentración máxima en plasma que se obtiene, dependerá de la dosis ingerida. Si se consideran dosis puntuales de cafeína pura, en estudios donde se usan cantidades superiores a 9 mg/kg, los picos de concentración en plasma son de 60-70 μM . Con dosis de 6 mg/kg, se obtienen concentraciones en torno a 40-50 μM [24, 25], mientras que con dosis iguales o inferiores a 3 mg/kg, la concentración se reduce hasta 15-30 μM [26]. En algunos estudios las concentraciones de cafeína en plasma se han determinado con la ingesta de café. En este sentido, Fredholm et al. [27], simplifican las

observaciones estableciendo que, de media, un café produce un pico de cafeína plasmática de 1-10 μM , mientras que la ingesta de 2-3 cafés aumentan dicho pico hasta 20-50 μM . En otro estudio se observó un pico de 27 μM tras la ingesta de 132 mg de cafeína repartidos entre 2 cafés y chocolate, después de un periodo de abstinencia de cafeína de 15 h [28]. Estas concentraciones, pese a considerarse picos máximos tras la ingesta de cafeína o café, pueden mantenerse estables durante horas, tanto por la propia metabolización de la cafeína como por el aporte continuado de esta sustancia en base a la toma cada pocas horas de productos como el propio café. Así, Lelo et al. [29] observaron una concentración media de cafeína plasmática de 25 μM en aquellas personas que consumían cafeína a lo largo del día, con una ingesta entre 179-849 mg (ingesta *ad libitum*). Estos resultados eran ligeramente superiores a los obtenidos por De Leon et al. [30], que mostraban diferentes concentraciones en función de si los sujetos tomaban 1-2 cafés al día (13 μM) o 5-6 cafés (17 μM).

Tal como se ha indicado previamente, la cafeína se metaboliza de forma relativamente lenta. En humanos, el primer paso de la metabolización consiste en la 3-demetilación de la cafeína a paraxantina (aproximadamente el 82% de la cafeína ingerida sigue esta ruta), proceso catalizado por la enzima CYP1A2 [10, 31], mientras que las vías que llevan a la formación de teobromina y teofilina, catalizadas por el citocromo P450 2E1 [31], no son tan habituales (12% y 6% respectivamente) [32]. Al final del proceso del metabolismo de la cafeína, la mayor parte habrá sido reconvertida en distintos subproductos que pueden ser clasificados según su concentración y que son eliminados por la orina. El mayoritario es el ácido 1-metilúrico (26,5%), seguido de la 1-metilxantina (19%), 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo (AFMU) con un 16%, 7-metilxantina (7,5%), paraxantina (6,5%) y la 3-metilxantina (3%) [32], además de que una parte de la cafeína, en torno al 1%, es excretada como tal, sin ser modificada por la orina [33].

Todo el proceso del metabolismo de la cafeína puede estar influenciado por variaciones en dos genes, CYP1A2 y receptor de adenosina A_{2a} (ADORA2A), que podrán modificar la respuesta del organismo a la ingesta de cafeína. Variaciones en el gen CYP1A2 tienen un impacto en el metabolismo de la cafeína, dado que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en la posición 734 (-163 C>A) han sido identificados como el punto más inducible sobre los cambios en el metabolismo de dicha sustancia [31, 34]. De esta manera, nos encontramos con tres posibilidades: individuos homocigóticos A/A, que corresponden al 40% de la población, y que tienen la capacidad de metabolizar adecuadamente la cafeína, e individuos heterocigóticos A/C y homocigóticos C/C, 50% y 10% de la población respectivamente, que se pueden

englobar en conjunto ya que ambos presentan una metabolización “lenta” de la cafeína. Esta característica les daría la peculiaridad de prolongar su vida media, aunque son necesarios más estudios para determinar cuánto tiempo es prolongable la vida media de la cafeína en las personas con dicha característica [31].

Por otro lado, encontramos el gen ADORA2A, que codifica para los receptores de adenosina tipo 2a, que se encuentran en el cerebro y en las células del sistema inmune, principalmente. Estos receptores tendrán un papel clave en la desregulación de la dopamina y la lanzadera de glutamato [31]. Al igual que con el CYP1A2, SNPs en la posición 1976 C>T tienen un efecto relacionado con la cafeína. La distribución poblacional de los genotipos divide a la población en personas que presentan un alelo C (C/C o C/T), a las que se les ha nombrado como “sujetos que no responden a la cafeína” y los homocigotos T/T [31]. Esta característica podría estar relacionada con la toma diaria de cafeína, tal como muestra un estudio en el que los individuos T/T tenían un menor consumo de cafeína que los C/C [35].

1.1.3 Mecanismos de acción de la cafeína

El principal mecanismo de actuación de la cafeína es como antagonista de la adenosina. La adenosina es un nucleósido purínico formado por una molécula de adenina unida a una molécula de ribosa y es sintetizada, tanto de forma extracelular como intracelular, por medio del metabolismo del adenosín trifosfato (ATP) [36]. En el caso de ser sintetizada intracelularmente, ésta difunde al exterior a través de transportadores pasivos por medio de un gradiente de concentración. Una vez se encuentre en el exterior de la célula, podrá pasar a ejercer su función en otras células mediante la unión a los receptores de adenosina [37]. Los receptores de adenosina que a día de hoy se conocen en detalle son cuatro: A₁, A_{2a}, A_{2b}, A₃ [38] y sus características principales pueden observarse en la tabla 1. Todos estos receptores forman parte de la familia de receptores acoplados a proteína G [37], y están ligados a la enzima adenilato ciclasa, que cataliza la formación del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC) [39]. Estos receptores presentan una estructura que incluye siete hélices- α transmembrana con el extremo amino-terminal dirigido hacia el exterior y una hélice- α transmembrana unida a un dominio amino-terminal, lugar donde se une la adenosina. Por otro lado, el extremo carboxi-terminal (punto de acoplamiento de las proteínas G) presenta residuos de treonina y serina que serán las dianas para la fosforilación de las proteínas quinasas, permitiendo la anulación de la sensibilización de estos receptores [40].

Tabla 1. Tipos de receptores de adenosina y sus características principales.

Receptor	Efecto de la adenosina sobre Adenilato ciclasa	Kd (cafeína, μM)	Tejidos
A₁	Inhibe	12	Músculo Hipocampo Cerebelo
A_{2a}	Activa	2,4	Sistema inmune Células dendríticas Ganglios basales
A_{2b}	Activa	13	Sistema inmune Neuronas Astrocitos Microglía
A₃	Inhibe	80	Hipocampo Cerebelo Neuronas Astrocitos Microglía

Kd: constante de disociación. Adaptado de Csóka, B [38].

Al unirse a su receptor, y dependiendo del tipo de receptor, la adenosina activará o inhibirá la enzima adenilato ciclasa, con la consecuente modificación de los niveles de AMPc [39]. En el caso de los receptores A₁, la acción de la adenosina inhibe la adenilato ciclasa, deteniendo la síntesis de AMPc, ya que dichos receptores se encuentran unidos a proteínas del tipo Gi o Go [27]. Paralelamente, se produce la apertura de los canales de K⁺ y la inhibición de los canales de Ca²⁺, permitiendo la señalización neuronal. Su funcionalidad depende de la vía de la proteína quinasa A-ciclasa dependiente de AMPc o de unas proteínas intercambiadoras activadas por AMPc [38, 41]. Estos receptores A₁ se encuentran mayoritariamente en el músculo esquelético, además de en el hipocampo, cerebelo y neuronas de la corteza.

Los receptores A_{2a} se encuentran unidos a proteínas del tipo Gs [27], que activan la adenilato ciclasa y, por tanto, aumentan las concentraciones de AMPc. Estos receptores son los mayoritarios en las células del sistema inmune, aunque también están presentes en regiones postsinápticas de los ganglios basales y en las espinas dendríticas. En cuanto a los receptores A_{2b} , que también están unidos a proteínas Gs, y, por lo tanto, activarán la adenilato ciclasa, se distribuyen en menor medida en las células del sistema inmune, así como en células neuronales y gliales. Por último, los receptores A_3 se encuentran en bajas concentraciones en el hipocampo, astrocitos, cerebelo y microglía y, al igual que los receptores A_1 , la unión de la adenosina con estos receptores inhibe la producción de AMPc.

La cafeína, actuando como antagonista de la adenosina, uniéndose a sus mismos receptores, inducirá cambios en los niveles de AMPc que serán contrarios a los descritos para la adenosina. Cada tipo de receptor tendrá una tendencia diferente a unirse con la cafeína. Observando la tabla 1 se pueden apreciar las diferencias en cuanto a la constante de disociación (Kd) entre los 4 receptores. Así, el receptor A_{2a} es el que tiene una mayor afinidad por la cafeína, mientras que el receptor A_3 es el que menos. Esto implicará que, tras la ingesta de cafeína, ésta actuará principalmente sobre aquellas células que contengan receptores con una afinidad superior por la cafeína, caracterizada por valores inferiores de Kd. Relacionándolo con el apartado anterior, donde se comenta que con la toma de un café ya se alcanza un pico de unos 13 μ M [30], la cafeína se unirá a los receptores A_1 , A_{2a} y A_{2b} .

Además de actuando como antagonista de la adenosina, la cafeína puede modificar la concentración de AMPc por medio de otros mecanismos. Uno de ellos es debido a su capacidad de inhibición de la fosfodiesterasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de ciertas moléculas, como el caso de AMPc [42]. Por lo tanto, en presencia de cafeína, siguiendo este mecanismo, los niveles de AMPc seguirían en concentraciones elevadas, ya que se inhibiría su hidrólisis. Sin embargo, se ha descrito que la concentración necesaria de cafeína para que se dé esta inhibición parece ser más elevada que la concentración fisiológica, al menos para las formas de la enzima fosfodiesterasa que se han podido caracterizar al detalle [27, 42-44]. Por otra parte, se ha observado que la cafeína es capaz de inhibir la acetilcolinesterasa, un tipo de esterasa que tiene como actividad la hidrólisis de la acetilcolina, neurotransmisor presente en el sistema nervioso central y periférico cuyos receptores se encuentran en leucocitos y otros tejidos [45]. La acetilcolina tiene, entre otras funciones, la transmisión de señales hasta el músculo esquelético y glándulas terminales [45]. Finalmente, otro de los posibles mecanismos de actuación de la cafeína sería a través de la movilización

del calcio intracelular a través del retículo sarcoplasmático. Concentraciones de cafeína superiores a 1 mM [34, 46-48], mayores de las que se pueden conseguir mediante la toma de 9 mg cafeína/kg de peso, provocan un aumento de la sensibilidad al calcio de un canal liberador de calcio sensible a ADP cíclico-ribosa, el llamado canal sensible a la rianodina, provocando la liberación del calcio intracelular almacenado en el retículo sarcoplasmático del músculo [46].

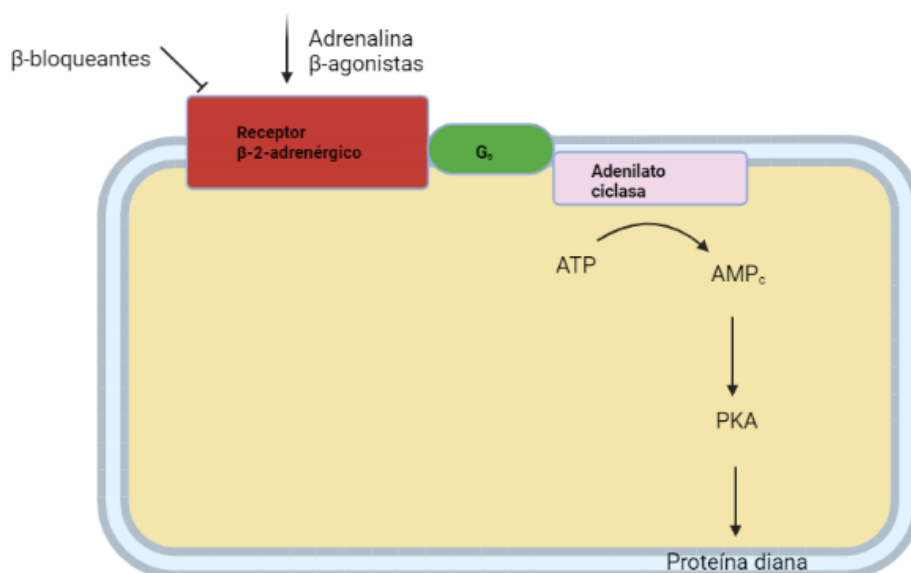


Figura 1. Efecto de la adrenalina sobre el receptor β -2-adrenérgico.

Adaptado de Cairns, S.P. et al. [49].

En el organismo, la cafeína provoca un aumento de los niveles de adrenalina ya sea de forma directa, estimulando las glándulas suprarrenales, o indirecta, causando un aumento de la señal de salida [46, 50]. Este aumento de los niveles de adrenalina, provocará una estimulación de los receptores β -2-adrenérgicos con la consecuente activación de la adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc, tal y como se puede observar en la figura 1 [49]. En el caso del cortisol, la ingesta de cafeína provoca una estimulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (EHHA), aumentando los niveles de adrenocorticotropina y, por consiguiente, un aumento de cortisol [51], aunque este efecto no se observa con la misma frecuencia que en el caso de la adrenalina. Por otro lado, en la tabla 1 anteriormente comentada, se observa como el receptor A_1 , que se encuentra en algunas células del SNC, responde como inhibidor de la adenilato ciclasa en respuesta a la adenosina. Entonces, tras la administración de cafeína, se producirá la acción antagónica, un aumento de AMPc. Según Lovallo et al. [51], la acumulación del segundo mensajero en la pituitaria, estimulará la expresión del gen del factor

liberador de corticotropina, estimulando la producción de adrenocorticotropina y aumentando los niveles de cortisol al igual que ocurre con el EHHA [51].

Por tanto, en resumen, se podría decir que, en el organismo, la cafeína provocará un aumento de los niveles de adrenalina y, probablemente, de cortisol. A nivel local, la cafeína, modificará los niveles de AMPc, aunque los cambios dependerán del receptor mayoritario de adenosina que se encuentre en cada tejido.

1.1.4 Efectos generales de la cafeína en el organismo

El mecanismo de acción de la cafeína consiste en el bloqueo de los receptores de adenosina tipo A_1 y A_{2a} [27]. La adenosina es una sustancia transmisora del SNC que cuando actúa transmite mensajes de disminuir la actividad allí donde establezca comunicaciones [27, 48]. Los receptores de la adenosina están ampliamente distribuidos por el encéfalo, con una gran cantidad de estructuras cruciales para la ejecución de las habilidades cognitivas como son el hipocampo, la corteza cerebral, la corteza del cerebelo y el tálamo [27]. El bloqueo de los receptores de la adenosina, por tanto, impide que ésta se una a los receptores y actúe en el SNC, revirtiendo en incrementos moderados de transmisión o actividad de los sistemas de neurotransmisión que disponen de receptores de adenosina, clasificados en noradrenérgico, colinérgico, dopaminérgico y serotoninérgico [27, 48]. En concreto, el bloqueo o antagonismo químico sobre los receptores A_1 , que se hallan situados en las neuronas presinápticas o emisoras, se traduce en una mayor liberación de estos neurotransmisores cuando se produce una comunicación, como se aprecia en la figura 2 [48].

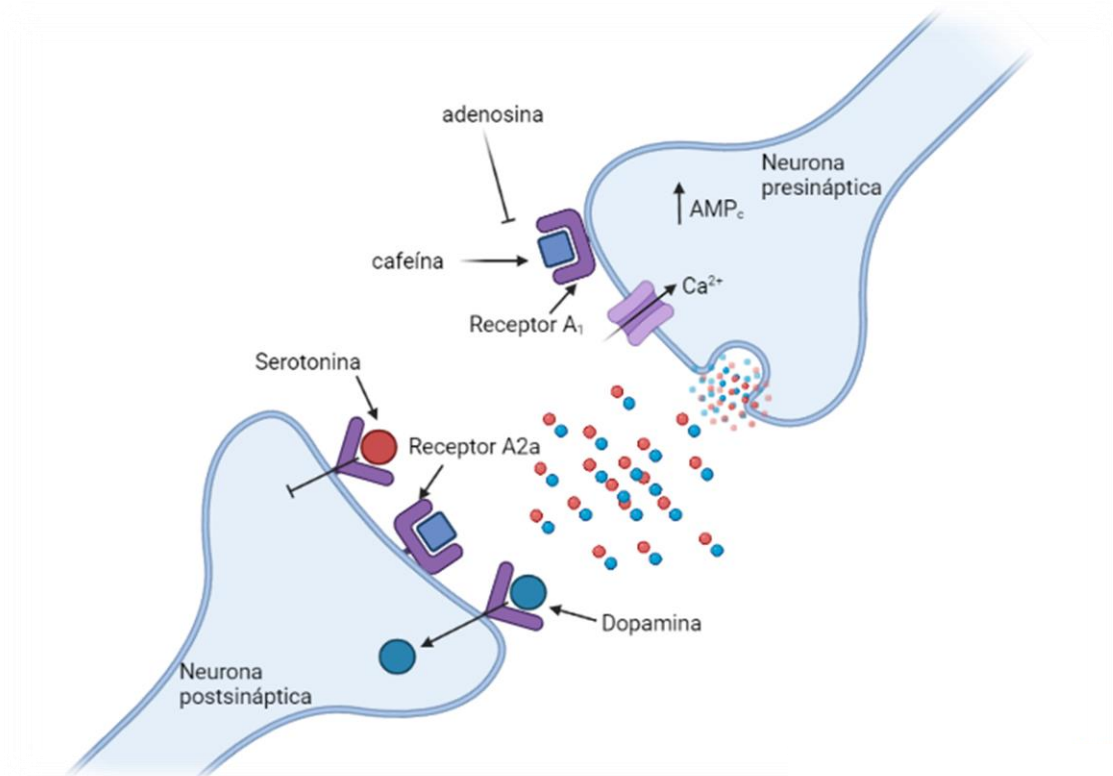


Figura 2. Bloqueo de los receptores de adenosina por parte de la cafeína y las consecuencias en la liberación de neurotransmisores. Adaptado de Kalmar, J.M. et al. [48].

El bloqueo o antagonismo químico sobre los receptores A_{2a} , situados en neuronas postsinápticas o receptoras, potencia que los receptores tipo 2 de la dopamina incrementen su actividad y procesen más información [48, 52]. Pero, en el caso de la serotonina, la ingesta de cafeína resultará en una disminución en la concentración de dicho neurotransmisor, debido al bloqueo de los receptores A_1 y A_{2a} en el SNC [48, 53] o por la inhibición de la triptófano hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de serotonina, cuya inhibición ha sido descrita en ratas [54].

Debido a que el principal efecto de la cafeína es actuar sobre el SNC, los efectos sobre el sistema cognitivo son consecuentes. Modelos neuroquímicos han establecido que el antagonismo producido por la cafeína en los receptores de adenosina A_1 y A_{2a} induce un aumento de la excitación durante periodos de insomnio [8], debido a la inducción sobre las proyecciones neuronales estriadas y la reducción de las señales inhibitorias hacia estos tipos de neuronas [8]. De esta manera, la cafeína afecta a los estados de vigilancia, atención y tiempo de reacción de la persona que la haya ingerido [8], pudiendo, además, afectar a la calidad y duración del sueño [8, 34]. En estos casos,

los niveles de serotonina tienen una función importante. Se han relacionado niveles elevados de serotonina con estados de fatiga, siendo la ratio serotonina/dopamina un indicador del estado de fatiga central [53]. Las consecuencias de un consumo habitual de cafeína sobre la memoria parecen ser positivas, quizás por un efecto neuroprotector de la cafeína [27], aunque la evidencia no es definitiva [8]. Por otro lado, la ingesta de cafeína puede tener efectos positivos en cuanto a retomar los ciclos circadianos después de un cambio importante o frente al *jet lag* [34]. El aumento de la contractibilidad, mediante el mecanismo de movilización de calcio intracelular a través del retículo sarcoplasmático [46], induce la activación endotelial del óxido nítrico sintasa, con la consiguiente producción de altas cantidades de óxido nítrico [42, 55].

La cafeína también puede afectar algunos aspectos de la circulación sanguínea [10, 56]. Como ya se ha comentado anteriormente, la cafeína induce a un aumento de la concentración de adrenalina, la cual provocará una reducción de la circulación esplácnica y renal por el efecto vasoconstrictor, derivado de la interacción de la adrenalina con receptores adrenérgicos, presentes en los vasos sanguíneos de estas regiones [57-61]. Aun así, Daniels et al. [62] otorgan este proceso a los efectos de la cafeína sobre los receptores de adenosina, ya que se ha observado como la infusión de adenosina provoca aumentos del flujo sanguíneo en la región esplácnica y la zona del antebrazo. En condiciones basales, con niveles normales de adenosina, la estimulación de los receptores A_1 provoca un descenso de la actividad de renina y consecuentemente, niveles menores de angiotensina II (ANG II), provocando un aumento del flujo sanguíneo como se ha comentado en la sección referente a mecanismos de acción. Pero, cuando se ingieren cantidades significativas de cafeína, los niveles de ANG II se reducen, provocando una disminución del flujo sanguíneo [62]. En cualquier caso, estos efectos estarían mediados por cambios en la concentración de AMPc. Casos más concretos han detallado como la toma de 250 mg de cafeína es capaz de reducir el flujo sanguíneo cerebral entre un 22-30% [63], aumentando la presión sanguínea [10, 56]. Se ha observado que la ingesta de cafeína provoca un aumento tanto de la presión sistólica como la diastólica en 3-14 mm Hg y 4-13 mm Hg, respectivamente [56, 62], ocurriendo en el mismo espacio de tiempo en el que se observa el aumento de la concentración de cafeína en plasma [23]. Estos aumentos de presión se mantienen durante 2-4 horas [56]. La vasoconstricción producida por la ingesta de cafeína no parece afectar al ritmo cardiaco [10], pese a que algunos autores observan un pequeño descenso [56], resulta un parámetro con resultados muy dispares y que parecen depender de la cantidad de cafeína ingerida [10].

1.1.5 Cafeína y actividad física

La cafeína es una sustancia ampliamente utilizada por los deportistas por sus efectos ergogénicos demostrados, con cerca de un 75% de los atletas recurriendo habitualmente a su uso en competición [31]. Aun así, cabe comentar que, pese a ser ampliamente utilizada, su consumo es inferior a las dosis recomendadas para obtener el efecto ergogénico deseado. A pesar de que hoy en día la cafeína está considerada una sustancia permitida por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA), no siempre ha sido así. Hasta hace poco más de 15 años, la cafeína estaba catalogada como producto dopante por el Comité Olímpico Internacional (COI), siempre y cuando la concentración en orina previa a competición superara los 12 mg/litro, pero dado que realizando tomas previas de 9 mg cafeína/kg peso (cantidad superior a la mínima ergogénica) difícilmente se llegaba al valor impuesto por el COI, sumado a que la cafeína se encuentra en multitud de alimentos y que estas dosis no resultan peligrosas para el ser humano, en 2004 la AMA decidió excluirla de la lista prohibida [31].

Deportivamente, la toma de cafeína se debe a sus efectos ergogénicos, partiendo todos ellos de un mecanismo en común, que es la estimulación del SNC [64], y que tiene como efecto retrasar la percepción de fatiga [65-67], lo que principalmente ha llevado a la mejora en el rendimiento en pruebas de intensidad submáxima (prolongar el tiempo durante el cual se puede realizar un ejercicio manteniendo la intensidad) [68]. Como se ha comentado anteriormente, la ratio serotonina/dopamina es un indicador de fatiga central, y, por lo tanto, niveles elevados de serotonina podrán tener consecuencias sobre un peor rendimiento deportivo [53]. El ejercicio físico *per se* puede inhibir la síntesis de serotonina, por un incremento en los niveles de dopamina en algunas zonas del cerebro [53]. Lee et al. [52] observaron un aumento en los niveles de dopamina tras la ingesta de 3 mg cafeína/kg peso y la realización de 40 minutos de carrera al 75% del consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx). En cuanto a los valores de serotonina, aumentaron tanto en el grupo control como en el suplementado, pudiendo estar relacionado con la posibilidad de que el propio ejercicio físico pueda inducir, de alguna manera desconocida a día de hoy, a un aumento de los niveles de serotonina. Adicionalmente, se han atribuido a la cafeína mejoras en la concentración o niveles de alerta y un desarrollo de la fuerza muscular [2], ayudando a la recuperación, ya sea por aumento de antioxidantes, protegiendo a las células del daño oxidativo producido por los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) [69] o reparando el daño o dolor muscular post ejercicio [70, 71], así como promover la lipólisis [72].

Estos efectos ergogénicos podrían estar condicionados por la propia genética del deportista. En anteriores apartados se ha descrito como existen principalmente dos genes que pueden modificar la respuesta del organismo a la ingesta de la cafeína, CYP1A2 y ADORA2A. De esta manera, se cree, que aquellos individuos con una metabolización “lenta” (A/C y C/C para el gen CYP1A2) obtendrían un mayor efecto ergogénico por la toma de la cafeína ya que dicha sustancia estaría durante más tiempo en el organismo en concentraciones significativamente elevadas [31]. Aun así, los estudios de Womack et al. [73, 74] observaron cómo tras la toma de 6 mg de cafeína, los resultados en una prueba de 60 minutos en bicicleta eran mejores en los grupos homocigotos A/A, poniendo en duda las conclusiones anteriores. Además, el resto de los estudios realizados hasta ahora no permiten sacar conclusiones convincentes, ya que la mayoría han usado protocolos de ejercicio con una duración inferior a una hora [75], limitando mucho el efecto de la cafeína en el grupo de metabolización más lenta. Hoy en día, no son muchos los estudios que han relacionado el consumo de cafeína con el gen ADORA2A y su efecto ergogénico, mostrando resultados distintos. En el estudio de Loy et al. [76], un grupo de mujeres tuvieron que pedalear durante 10 minutos al máximo después de haber realizado 20 minutos de un calentamiento de intensidad moderada. Los resultados mostraron como todas las participantes homocigotas T/T aumentaron su rendimiento en los 10 minutos tras la toma de cafeína. En cambio, solo una de las participantes pertenecientes al grupo homocigoto C/C y heterocigoto C/T obtuvo mejores resultados en la prueba tras la ingesta de cafeína. Según las descripciones realizadas anteriormente, este peor rendimiento en las personas C/T y C/C es debido a tener una menor respuesta a la acción de la cafeína [31]. En cambio, Grgic et al. [77] en un reciente estudio observaron que tanto los grupos C como los T/T obtenían mejoras de rendimiento (velocidad, potencia, salto) tras la toma de 3 mg cafeína/kg peso, aunque los mismos autores comentan las discrepancias entre estudios ya que los protocolos usados fueron distintos. Además de que una parte de las personas encuestadas o incluidas en el estudio reconocía si se le estaba administrando cafeína o placebo.

La mayoría de estudios iniciales aseguraban que la cantidad de cafeína necesaria para obtener un efecto ergogénico era en dosis próximas a 10-13 mg/kg de peso [26]. El problema era que estas dosis tan elevadas, equivalentes a tomarse 5-7 tazas de café para una persona de 70 kg de peso, inducían a problemas gastrointestinales o nerviosismo. Uno de los estudios clásicos fue el realizado por Graham et al. [78], quien observó que tras un consumo de 9 mg cafeína/kg peso se aumentaba el tiempo hasta la fatiga en pruebas de atletismo y ciclismo. Cuando la dosis

se redujo a 5-6 mg/kg se observó que se mantenían los efectos ergogénicos, pero con el beneficio de reducir considerablemente los efectos secundarios. Incluso con dosis más bajas (3 mg/kg), estos efectos ergogénicos seguían siendo significativos, aunque inferiores a los generados por las dosis de 6 mg/kg [26]. Hodgson et al. [79] observó como la toma de cafeína (5 mg/kg) 1 h antes de una prueba ciclista de 45 minutos tenía efectos positivos sobre la potencia media y el tiempo necesario para completar la prueba (un 5% de mejora), respecto al grupo placebo. Siguiendo con dosis dentro de este rango, Costill et al. [80] también atribuyó el aumento del tiempo de correr a una determinada intensidad, en este caso, del 80% del $\text{VO}_2\text{máx}$, al efecto de la cafeína.

Por lo tanto, los resultados observados en estos y otros estudios, llevaron a proponer la idea general de que los efectos óptimos de la cafeína en cuanto a la mejora del rendimiento se observan después del consumo de dosis entre 3-6 mg cafeína/kg de peso, en ejercicios de 45-60 minutos de duración, sobre todo cuando las vías metabólicas y sus sustratos energéticos no son un factor limitante, y sin efectos ergogénicos adicionales de dosis superiores [68, 81].

Sin embargo, y a pesar de que históricamente sus efectos ergogénicos se han estudiado en pruebas con un componente aeróbico muy elevado, estudios más recientes indican efectos positivos en ejercicios de fuerza y potencia muscular [82, 83], así como en pruebas supramáximas, ayudando al reclutamiento de fibras musculares y a la propagación del estímulo nervioso [81, 84]. Duncan et al. [83] observaron como la toma de 3 mg cafeína/kg peso tenía efectos sobre el sistema muscular, aumentando el número de repeticiones y el peso en cada una de ellas en un ejercicio de extensión de piernas, respecto al grupo control. Del Coso et al. [85] observaron como la toma de cafeína a distintas dosis (1 a 3 mg/kg) tenía diferentes efectos sobre la potencia en ciertos ejercicios. Así como a dosis bajas no se observaban diferencias, a dosis mayores se producía un aumento de la potencia en media sentadilla y *press banca*, además de aumentar la tensión arterial y el ritmo cardíaco. Un ejemplo del abanico de efectos que tiene la cafeína es el estudio realizado por Del Coso et al. [86], en el que observaron como la toma de un tipo de bebida energética libre de azúcares con cafeína (3 mg/kg), tomada 60 minutos antes de un partido de fútbol americano tenía como efectos significativos un aumento del salto vertical, mayor distancia recorrida con velocidades superiores a los 13 km/h, mayor velocidad media durante el test de esprints y un mayor número de esprints durante el encuentro. Bloms et al. [87] también observaron evidencias de mejora de salto en atletas tras la ingesta de cafeína (5 mg/kg) y Trexler et al. [88] relacionaron la ingesta de cafeína con una mejora del rendimiento en esfuerzos de muy corta duración y muy alta intensidad sobre cicloergómetro. El

rendimiento en pruebas de velocidad también fue estudiado por Goods et al. [89] pero en nadadores que completaron 6 repeticiones de 75 metros (esprints intermitentes), observando una mejora en el día que se tomó cafeína, evidenciando el abanico de condiciones en las que la cafeína tiene efecto.

Pese a que, como se ha explicado en anteriores apartados, la estimulación del SNC es el principal efecto de la cafeína sobre el organismo, los consecuentes efectos que tendrá este hecho en el metabolismo energético resultarán claves desde el punto de vista del ejercicio físico. Una característica común en los estudios sobre cafeína y ejercicio es el aumento de la lipólisis [46, 72, 90, 91]. Algunos estudios observan una mayor concentración de ácidos grasos libres en plasma [46, 90], debido a la acción lipolítica de la cafeína [91], aunque existen resultados contradictorios [92]. De todos modos, este incremento de ácidos grasos libres en plasma no se corresponde con un mayor uso de ellos durante el ejercicio, manteniendo la idea de que es el antagonismo de la cafeína sobre los receptores de adenosina, explicado anteriormente, el que provocará el efecto ergogénico [92, 93]. Por razones hoy en día desconocidas, estos procesos lipolíticos son más evidentes en población no entrenada o sedentaria que en población entrenada, aunque el hecho de que se observen picos de cafeína inferiores en las entrenadas podría ser un indicativo de su afectación sobre el metabolismo lipídico [93].

La ingesta de cafeína también provoca un aumento de las concentraciones de lactato en sangre durante y después del ejercicio [71, 79, 94]. Esta acumulación de lactato en sangre es dependiente del balance entre el lactato producido por los músculos activos y el lactato eliminado por el hígado [24]. Según Glaister et al. [94], resulta poco probable que el aumento de lactato inducido por cafeína provenga de músculos no activos durante el ejercicio. Dos mecanismos han sido propuestos para comprender el aumento de lactato. El primero es que la cafeína aumente la actividad anaeróbica por su acción sobre los receptores de adenosina, evitando los efectos inhibitorios de la adenosina sobre la fosfofructoquinasa del músculo esquelético [95]. Y, en segundo lugar, que el aumento de adrenalina promoviera, a través de la estimulación de los receptores β -adrenérgicos, una aceleración en la velocidad de la glucogenólisis y glucólisis [95, 96], aumentando la producción de lactato y, también, reduciendo la absorción de lactato por parte de los músculos activos [97]. Además, el mayor aumento de adrenalina que suele inducir la cafeína disminuiría la circulación esplácnica, lo que llevaría a una menor metabolización del lactato por parte del hígado [57].

El momento del día para la toma de cafeína es un factor a tener en cuenta. Debido a los ritmos circadianos, el rendimiento en competiciones que se disputan por la

tarde es estadísticamente mejor que en aquellas que se celebran por la mañana [34], ya que el rendimiento neuromuscular se reduce, pudiendo ser debido a la menor temperatura corporal [98]. Aun así, Mora-Rodríguez et al. [98] observaron como la toma de cafeína a primera hora de la mañana readaptaba el rendimiento neuromuscular (fuerza muscular y potencia) a valores observados en pruebas más tardías.

Una duda que hoy en día está sin resolver es si un protocolo de toma de cafeína durante un tiempo determinado tendría efectos a largo plazo sobre adaptaciones fisiológicas al entrenamiento. En un estudio se administraron 201 mg de cafeína durante 8 semanas a un grupo de corredores que realizaban una prueba de 45 minutos, 3 días a la semana [99]. Los resultados indicaron que no había diferencias significativas entre el grupo suplementado y el control en el aumento del consumo máximo de oxígeno al finalizar el estudio. Además, se ha observado que la toma de cafeína durante un periodo de tiempo prolongado puede implicar tolerancia a los sujetos [93]. Lara et al. [100] realizaron un estudio de 20 días de duración en el que las personas, habituales deportistas, ingerían 3 mg diarios de cafeína por kg de peso corporal, realizando una prueba para determinar el pico de potencia aeróbica, tres veces a la semana. Pese a observarse un aumento del 4% en este parámetro en los primeros 15 días, éste no aumentó más, durante los últimos días del estudio. Aun así, se requieren más pruebas de este tipo para poder llegar a una conclusión firme, ya que el número de estudios realizados en este sentido es muy limitado.

En general, se puede concluir que el efecto de la cafeína se debe a mecanismos estimulantes, retrasando la percepción de fatiga, en aquellos ejercicios que no vean comprometidas las reservas energéticas. Aun así, pese a que tradicionalmente los ejercicios estudiados han sido de una duración de entre 45-60 minutos cada vez hay más evidencia de efectos significativos en pruebas más cortas.

1.2 Actividad física e inflamación sistémica crónica de bajo nivel

1.2.1 Inflamación sistémica crónica de bajo nivel

La inflamación es una respuesta natural del organismo debido a una infección, un daño o alguna situación anómala o alteración. Se caracteriza por producir de manera local y sistémica un aumento de productos solubles y de citocinas, iniciadas por el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y seguidas por la interleucina (IL) 1 β , IL-6, el receptor antagonista de interleucina 1 (IL-1ra), así como receptores solubles de TNF α [101, 102]. Estas citocinas son unas pequeñas proteínas (8-80 kDa de peso) que tienen un papel integrador y regulador en las comunicaciones intercelulares [103], y están presentes en procesos tan diferenciados como apoptosis, proliferación, migración y diferenciación celular o inflamación y respuesta inmunitaria, además de tener un rol importante en el control de la homeostasis. De esta manera, pueden actuar sobre el sistema nervioso, endocrino, inmune, o sobre aspectos como la fatiga, el apetito, la temperatura corporal o el metabolismo. Su producción depende principalmente de las células del sistema inmunitario, pero en algunos casos, otros tejidos, como el músculo esquelético o el tejido adiposo, también pueden ser productores claves y mayoritarios. Dependiendo de su papel en el proceso de inflamación podemos diferenciar las citocinas en dos tipos: proinflamatorias y antiinflamatorias, tal y como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Principales citocinas y su carácter inflamatorio.

Citocina (IL)	Carácter
TNF α	Proinflamatoria
IL-1 (α - β)	Proinflamatoria
IL-6	Antiinflamatoria/Proinflamatoria
IL-10	Antiinflamatoria
IL-12 (dímero p35/p40)	Proinflamatoria (subunidad p40 inhibe IL-12)

Elaboración propia.

En el caso de una infección o trauma, las concentraciones de los compuestos proinflamatorios pueden aumentar del orden de 7 u 8 veces sus valores basales y, al cesar el estímulo, volver a valores basales, lo que en conjunto corresponde a la situación conocida como inflamación aguda. Además, esta inflamación aguda, incluye elevaciones más tardías de elementos antiinflamatorios, que suelen ser claves para

limitar y concluir la respuesta inflamatoria en general, y proinflamatoria en particular. Entre estos elementos, encontramos la IL-10, considerada la interleucina antiinflamatoria por excelencia y uno de los elementos antiinflamatorios más importantes del organismo, cuya relevancia se irá detallando en los siguientes apartados. Por otra parte, encontramos en el organismo la situación conocida como inflamación sistémica crónica de bajo nivel. Esta situación se caracteriza por unos niveles plasmáticos crónicamente elevados de citocinas proinflamatorias y otros compuestos de características similares, con unas concentraciones que suelen duplicar o triplicar las basales o propias de personas sanas [102].

Como se ha indicado, dentro de la situación de inflamación sistémica crónica de bajo nivel, además de citocinas proinflamatorias, resaltan los niveles elevados de otros componentes proinflamatorios. Entre ellos destaca la proteína C reactiva (PCR), una proteína pentamérica de carácter proinflamatorio, cuya producción depende principalmente del hígado, a través de la biosíntesis hepática dependiente de IL-6, aunque las células musculares lisas, células del sistema inmunitario o los adipocitos también pueden producirla [104]. A pesar de que a lo largo del trabajo se considerará la PCR como un único componente, cabe comentar que actualmente se conocen dos isoformas de PCR, PCRn y PCRm, con características ligeramente diferentes en cuanto a su afectación sobre el sistema inmune [104]. Por otra parte, el estado de inflamación sistémica crónica también viene definido por niveles bajos de elementos antiinflamatorios [102]. Entre estos elementos podemos encontrar la IL-10 pero también la adiponectina, compuesto antiinflamatorio producido exclusivamente por el tejido adiposo a través de los adipocitos y que tiene características antagónicas a la PCR [105]. La adiponectina es, probablemente, la adipoquina más conocida. El término adipoquina hace referencia a aquellos compuestos liberados por el tejido adiposo, integrándolo como parte del sistema metabólico. Dependiendo de la disposición del tejido adiposo en cuestión, las adipoquinas liberadas diferirán en cuanto a tipología y concentración o cantidad liberada. Al igual que las citocinas, las adipoquinas también pueden ser clasificadas en función de su efecto inflamatorio. Así, encontramos adipoquinas proinflamatorias como la leptina, resistina, lipocalina 2 o la proteína relacionada con la angiopoyetina2 (ANGPTL2), y antiinflamatorias, entre las que destacan la propia adiponectina y la proteína secretada relacionada con el encrespamiento 5 (Sfrp5) [105]. Es destacable que se ha observado que los niveles de adiponectina son más elevados en mujeres que en hombres [106, 107].

Se ha propuesto que la inflamación sistémica crónica de bajo nivel tiene su origen en la acumulación de grasa en general, y de grasa visceral en particular [108],

siendo este depósito de grasa el que se acumula en torno a los órganos internos. Dentro de los elementos proinflamatorios que aparecerán, parece ser que el inicial es el TNF α [102], originado en el tejido adiposo, lo que provocará que aumenten las concentraciones de otras citocinas proinflamatorias. De hecho, se ha sugerido que la acumulación de grasa es la principal causa del aumento de los niveles de citocinas proinflamatorias [102].

La situación de inflamación sistémica crónica de bajo nivel está relacionada con muchas enfermedades crónicas y otras situaciones patológicas [102, 108-111]. En este sentido, multitud de estudios epidemiológicos han encontrado una relación entre la inflamación sistémica crónica y el riesgo de tener alguna enfermedad crónica, como artritis, cáncer, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) o arteriosclerosis [102, 108, 109]. Por ejemplo, en el caso de arteriosclerosis o demencia, los niveles de TNF α son elevados, en cambio no se observan niveles elevados de IL-6 [102]. Donde sí aumentan ambos valores es en casos como la obesidad, en personas fumadoras o en la DM2. En el caso de la DM2, está bien establecido como estas personas tienen una sobreexpresión de TNF α en el músculo esquelético, así como unos niveles elevados en plasma del propio TNF α [102, 110], y de IL-6 y PCR [111]. Estos indicadores, también son predictores significativos de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, como es el caso de la IL-6 [112], así como en el riesgo de sufrir infarto de miocardio, TNF α e IL-6, aunque en población mayor de 80 años parece ser mejor predictor de mortalidad la IL-6 que el TNF α , estando asociado este último solo al 7% de los casos [113]. Por otro lado, el aumento de PCR e IL-6 ha sido asociado con la incidencia de angina de pecho [112]. Dichos pacientes, aun siendo tratados con la misma terapia, tienen mejor pronóstico de la enfermedad cuando el descenso de los valores de IL-6 se produce antes de las 48 h del ingreso hospitalario [112], sugiriendo que la temporalidad en la aparición de IL-6 también debe tenerse en cuenta. Como se ha explicado antes, el aumento de PCR es dependiente de IL-6, y es por este motivo que ambos marcadores prácticamente siempre estarán ligados a sus aumentos [104]. La PCR puede provocar un aumento del riesgo de padecer trombosis, dado que dicha proteína induce a los monocitos en circulación a producir el factor tisular, conocido por ser un potente factor de coagulación [112]. Además, los niveles de PCR se han correlacionado con la puntuación de la escala Framingham de riesgo cardiovascular [102].

El TNF α es la citocina que más se ha estudiado en la inflamación crónica de bajo nivel. La mayor parte de su ARNm se encuentra en los adipocitos, que serán clave para el desarrollo de este proceso inflamatorio [114], por lo que los depósitos de grasa serán los implicados en su aumento, con una relación directa entre cantidad de grasa y

liberación de los componentes proinflamatorios, especialmente de TNF α . Una vez generado, será reconocido por sus receptores, mayoritariamente receptores TNF-R1, encargados de estimular la lipólisis y procesos apoptóticos, aunque también con los TNF-R2, involucrados en procesos de resistencia a la insulina [114]. Este aumento de concentración se ha asociado directamente con un efecto inhibitorio de la señalización de la insulina [115, 116], por atenuación de los receptores de insulina tipo IRS 1 en músculo y tejido adiposo, además de causar resistencia a la insulina de manera indirecta, mediada por un aumento de ácidos grasos libres liberados por lipólisis desde el tejido adiposo blanco [117-119]. Además, se ha observado que este aumento de TNF α no tiene efecto sobre la oxidación de ácidos grasos en el músculo, aunque sí produce la incorporación de ácidos grasos a diacilglicerol, producto relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina inducida por TNF α en el músculo en modelos animales [120].

Juntamente con la PCR, la IL-6 ha sido la otra citocina principalmente estudiada en relación con la inflamación sistémica crónica. En este caso, aunque también es secretada desde el tejido adiposo en cantidades correspondientes al 30% de la producción corporal total [108], en parte estimulada por la propia acción de TNF α [113], sus niveles dependientes directamente de los adipocitos apenas corresponden al 10% del total [114], ya que el resto depende de los macrófagos del tejido adiposo [108]. La IL-6 es una citocina que presenta una dualidad en el proceso inflamatorio, ya que es capaz de actuar como interleucina proinflamatoria o antiinflamatoria dependiendo de la temporalidad y magnitud de su presencia en el torrente sanguíneo. Mientras un aumento puntual y de gran magnitud puede ejercer un efecto antiinflamatorio, tal como se describirá posteriormente, si existen niveles moderados, pero crónicamente elevados de IL-6, sus efectos son de carácter proinflamatorio, y suele estar relacionada con concentraciones más elevadas de lo normal de PCR y TNF α , en una típica situación de inflamación sistémica crónica. Cabe comentar que aquellas líneas celulares de adipocitos, que han sido expuestas a IL-6 *in vitro*, expresan más supresor de citocinas-3 (SOC-3), hecho demostrado en pruebas *in vivo* y, cuya función es actuar como regulador negativo de la señalización de la insulina mediante unión y ubiquitinación de los receptores de insulina (IRS) 1 y 2, por lo tanto, IL-6 también puede provocar resistencia a la insulina [111].

A pesar de que tanto IL-6 como TNF α tienen en el tejido adiposo en sí mismo sus principales productores, existen otras alteraciones relacionadas con este tejido que afectan a la instauración de la inflamación sistémica crónica. A pesar de que hasta el momento se ha comentado que la acumulación de grasa es la principal causante de la

inflamación crónica de bajo nivel, dicha acumulación implica un aumento del número de macrófagos, que corresponde al 40% de la masa de los adipocitos, y que además conlleva un cambio hacia el fenotipo inflamatorio de estos macrófagos [121]. Mientras que, en personas con niveles adecuados de grasa, los macrófagos tienen características antiinflamatorias, en el caso de un aumento de los depósitos grasos adquieren un carácter proinflamatorio. Esto implica un reclutamiento de los macrófagos M1, encargados de secretar componentes proinflamatorios como TNF α , IL-6 e IL-1 β , en detrimento de los macrófagos M2, con características antiinflamatorias, induciendo a un aumento de la ratio M1/M2, que se ha relacionado con el desarrollo de la resistencia a la insulina [121, 122]. Aun así, la activación de los macrófagos en este caso es distinta a la clásica activación causada por una infección. En el caso que se trata, los macrófagos producen una serie de marcadores que regulan la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico. El aumento del número de macrófagos y su cambio al fenotipo proinflamatorio se ha relacionado con un aumento en el tamaño de los propios adipocitos, por incremento de su contenido en grasa. En esta situación, se ha establecido una relación entre el tamaño de los adipocitos y el riesgo de padecer obesidad [123]. Además, esta hipertrofia adipocitaria parece ser suficiente para causar resistencia a la insulina en el tejido adiposo, por defectos en el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4), independientemente de la propia inflamación dentro del adipocito, aunque el propio TNF α parece que puede afectar directamente [114]. Referente a esta inflamación de los adipocitos, la hipertrofia de éstos implicará un aumento de factores proinflamatorios como TNF α , IL-6, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y la IL-8 que actuarán sobre IRS-1, evitando la señalización de la insulina. Además, se ha establecido que un adipocito de mayor tamaño implicará una mayor liberación de TNF α [114], reclutando más cantidad de macrófagos, ya explicados en párrafos anteriores, y células T, además de inducir a una situación de hipoxia, activando el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF 1 α), que produce un aumento en la inflamación local y a la fibrosis del tejido adiposo. El tamaño de estos adipocitos puede llegar a duplicarse, dado que estudios han determinado un tamaño normal de adipocitos de 25 μ m de diámetro, mientras que adipocitos hipertróficos llegan a tamaños de 50 μ m [123]. Este aumento de TNF α en los adipocitos de mayor tamaño tiene consecuencias celulares, al menos en estudios *in vitro*. Así, se produce un bloqueo en la diferenciación de nuevos adipocitos, se promueve la desdiferenciación de adipocitos ya existentes o de preadipocitos y se induce a la apoptosis de los mismos, siendo los tres procesos mediados por TNF α [114]. La correlación entre altos niveles de PCR y bajos de adiponectina [105] es otra característica propia de un aumento del número de adipocitos. La adiponectina, ya introducida en el apartado anterior, tiene la capacidad de reducir la

hiperglucemia por acción de la insulina, aumentar la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético o reducir los niveles plasmáticos de glucosa en sangre, a pesar de que es inhibida por acción de TNF α o IL-6, siendo clave en los procesos que ocasionan síndromes metabólicos. Existe una correlación negativa entre niveles de adiponectina y acumulación de grasa visceral, viéndose reducidos en personas con DM2 [105]. Por el contrario, elevados niveles de adiponectina se han asociado con menor riesgo de padecer DM2 [105].

A pesar de que se ha descrito la cantidad de grasa como factor clave para el desarrollo de la inflamación crónica de bajo nivel, se ha establecido que algunos depósitos concretos de grasa pueden ser un factor más importante que el acúmulo global de grasa en el organismo [124]. Así, un aumento de la cantidad de grasa visceral, que es aquella que recubre los órganos y las vísceras, implicará una infiltración de macrófagos proinflamatorios y células T [108]. Además, se ha asociado un descenso de marcadores inflamatorios con una menor cantidad de grasa visceral [108], incluso sin conllevar una pérdida de peso, indicando el papel clave de la grasa visceral en la inflamación sistémica crónica. Estos depósitos de grasa se encuentran principalmente en la zona del abdomen e hígado y su expansión induce un aumento significativo de la producción de adipoquinas proinflamatorias como TNF α , leptina, proteína 4 unida a retinol, IL-6 o IL-18, mientras que adipoquinas antiinflamatorias como la adiponectina, ven reducida su producción [108]. Así, se encuentran casos de resistencia a la insulina en individuos con un índice de masa corporal normal, sin necesidad de padecer obesidad. En estos casos, la propia grasa visceral, a través de los procesos descritos previamente, induce una liberación de TNF α e IL-6, principales implicados en el desarrollo de la resistencia a la insulina [111, 114].

Finalmente, es importante resaltar que la inflamación sistémica aumenta a medida que la persona envejece, dado que diversos estudios han observado una asociación entre la edad y variaciones en los componentes inflamatorios [125, 126], hecho que se agrava si se trata de personas con enfermedades crónicas [102], pero que puede ser parcialmente contrarrestado si el sujeto se mantiene físicamente activo, tal y como se comentará en los siguientes apartados [126-128].

1.2.2 Relación entre la actividad física y la inflamación sistémica crónica de bajo nivel

La inactividad física también ha sido relacionada con la inflamación crónica de bajo nivel y el consecuente riesgo de padecer enfermedades crónicas [129]. Por otro lado, el ejercicio físico ha sido caracterizado como un promotor del estado antiinflamatorio del organismo, provocando un aumento de IL-10 y adiponectina, principalmente, y reduciendo los niveles de citocinas proinflamatorias [102, 108], así como el tamaño de los adipocitos [130].

Algunos estudios han determinado que el hecho de realizar actividad física de forma regular se correlaciona con niveles más bajos de sustancias proinflamatorias (TNF α , PCR, IL-6 o IL-1 β) y niveles más elevados de elementos antiinflamatorios como IL-10 [102, 131]. Smith et al. [127] observaron una reducción de la producción de agentes proinflamatorios (interferón γ (IFN γ), TNF α , IL-1 β) y un aumento del factor de crecimiento transformante β (TGF β), de la IL-4 e IL-10 en personas con riesgo a desarrollar isquemia, después de un programa de entrenamiento de 2,5 horas a la semana durante 6 meses. Además, los niveles de PCR se vieron reducidos en un 35%. Sanders et al. [132] buscaron una relación entre realizar actividad física y niveles de marcadores proinflamatorios como PCR y IL-1 β en pacientes con periodontitis. Los resultados mostraron como el hecho de realizar actividad física provocaba una reducción de los niveles de PCR en los individuos enfermos, pero este efecto no se observaba en los sujetos sanos. Aun así, no todos los estudios concluyen que exista una reducción de los niveles de PCR debido al ejercicio, como el meta-análisis realizado por Kelley et al. [133] donde no se observa dicha asociación.

Referente a población sana y/o deportista, Kohut et al. [134] realizaron un programa de 10 meses de duración, donde un grupo de estudio contaba con ejercicio aeróbico mientras que el otro grupo realizaba ejercicios de fuerza y flexibilidad. Al acabar el período de estudio observaron cómo grupo aeróbico había reducido los niveles de PCR entre un 10-15%, mientras que no se observó ningún cambio significativo en el programa de fuerza y flexibilidad, indicando que no solo es importante realizar actividad física, sino que el tipo de ejercicio que se realice también resulta determinante. Más concretamente, en sujetos ya previamente entrenados, el continuo entrenamiento también puede provocar un descenso de los niveles de PCR, como es el caso del estudio de Mattusch et al. [135], donde implementaron un programa de entrenamiento de 9 meses con el objetivo de realizar un maratón, reduciendo las concentraciones de PCR en un 31% al finalizar el estudio. Referente a la comparativa entre componentes pro y antiinflamatorios, El-Kader et al. [136] demostraron como un programa de 6 meses

de ejercicio aeróbico aumentaba los niveles de IL-10, mientras que reducía los de IL-6 y TNF α .

Referente a los estudios observacionales, distintos proyectos se han dirigido a analizar si existe una asociación entre niveles de ejercicio y reducción de la inflamación sistémica crónica, indicando una asociación inversa dosis-respuesta entre niveles de ejercicio y concentraciones de PCR [137]. La tercera encuesta nacional de salud y nutrición (NHANESIII) [138] relacionó el hecho de realizar actividad física más de 22 días al mes con un descenso del 37% en el riesgo de tener niveles elevados de PCR comparado con hacer deporte únicamente 3 veces mensuales. El resto de los principales marcadores inflamatorios, TNF α e IL-6, siguen un patrón similar a PCR, siendo menores sus concentraciones en plasma a medida que los niveles de actividad física son mayores. Con relación al correr, aquellas personas que corrieron más de 4 horas a la semana tenían un 6% menos de IL-6 y un 49% menos de PCR que aquellas que corrían 30 minutos a la semana [137].

En cuanto al sexo, los dos estudios de intervención realizados en Canadá con mujeres postmenopáusicas demostraron que el ejercicio físico regular no alteraba los niveles de IL-10 al cabo de un año de protocolo [139]. El aumento de IL-6, es un factor clave para el desarrollo de ciertas enfermedades, y concretamente se ha relacionado con mayor riesgo de tener cáncer de hígado, aunque en ratones se ha observado que las hembras tienen una menor probabilidad a padecerlo, relacionándose con un aumento de la señalización de los receptores de estrógenos, inhibiendo la expresión de IL-6. Resulta interesante observar cómo los valores de TNF α solo estaban asociados en la mortalidad en hombres, mientras que en mujeres no se daba dicha asociación. Según los autores, las razones no están claras, aunque bibliografía más moderna indica el papel protector de las hormonas femeninas como un factor clave [140]. De este modo, el gen que codifica para los receptores de estrógenos se expresa en linfocitos y monocitos, mientras que tanto dichos receptores como el estradiol promueven la producción de IFN1, indicando un primer mecanismo de defensa contra infecciones. Además, se ha observado que los linfocitos y monocitos de mujeres producen más IFN α en respuesta vírica en comparación con hombres. Dicho aumento también se ha observado en células cultivadas con estradiol. Además, el estradiol reduce la señalización de fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) y la fosforilación de la proteína quinasa B (Akt) en macrófagos, indicando una mayor superioridad de las mujeres en respuesta a infecciones [140]. Respecto a la adiponectina, se ha observado que sus niveles son más elevados en mujeres que en hombres [106, 107].

Los mecanismos implicados en estos efectos beneficiosos del ejercicio regular siguen sin estar claros, y es por esta razón que nos centraremos en la revisión de Gleeson et al. [108] en la que se proponen tres posibles hipótesis. En primer lugar, encontramos la reducción de la cantidad de grasa visceral, que tal y como se ha introducido al inicio del apartado, debe ser considerada aparte de los niveles de grasa totales. El aumento de este tipo de grasa, que suele almacenarse en la zona abdominal y que no siempre lleva asociado un aumento de peso, conlleva niveles más elevados de componentes proinflamatorios, iniciados también por $TNF\alpha$, así como una reducción en la producción de adiponectina. Además, un aumento de la grasa visceral va relacionado con hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, iniciándose el proceso conocido como estrés oxidativo, el cual va asociado a otros problemas como hiperlipidemia o hiperglucemia. Este estrés oxidativo se produce debido al desequilibrio de la balanza entre las ROS y los mecanismos antioxidantes del tejido adiposo, alterándose también los niveles del factor nuclear kappa beta (NF-KB) [141]. Además, la dieta y sobre todo la cantidad y tipo de grasa que se ingiere afecta también al estado inflamatorio del organismo [101]. De este modo, el ejercicio físico, a través de la reducción del perímetro de la cintura, asociada a niveles más bajos de grasa visceral, provoca una mayor liberación de adiponectina y menor cantidad de componentes proinflamatorios. Otro de los mecanismos implicados es la inhibición de la entrada de macrófagos al adipocito. Como se ha detallado en el subapartado anterior, un aumento del tamaño de los adipocitos conlleva a una infiltración de macrófagos y células T, que puede ser suprimida por el ejercicio físico, debido a variaciones en el gradiente de ciertas citocinas quimiotácticas y que conlleva cambios fenotípicos de macrófagos M1 a M2 [108]. Por último, la realización de programas de ejercicio continuado provocan una reducción de los receptores tipo Toll (TLR) en macrófagos y monocitos, relacionados con un aumento de citocinas proinflamatorias [108]. Por ejemplo, los niveles de TLR1, TLR2 y TLR3 se reducen tras sesiones de ejercicio intenso.

1.2.3 Sedentarismo como causa directa de la inflamación crónica de bajo nivel

Por otro lado, en los últimos años, se ha observado como el sedentarismo, definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como cualquier actividad que conlleve un gasto energético máximo de 1,5 equivalentes metabólicos (METs) [143], está relacionado con la inflamación sistémica crónica de bajo nivel, independientemente de la actividad física que realice o de la adiposidad [144-146]. Se ha asociado con un aumento de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares y cáncer, así como una mayor incidencia de sufrir problemas cardiovasculares, DM2 y cáncer [143], por lo que

se recomienda tanto en adultos como en la tercera edad, reemplazar los momentos de sedentarismo por actividad física, aunque sean de una intensidad menor [143]. Esto es debido a que se ha establecido que por cada 2 horas de ver la televisión al día, aumenta el riesgo de padecer obesidad en los próximos 6 años en un 23% y en un 14% de desarrollar DM2 [146]. Estudios con adultos australianos determinaron que estar sentado delante de la televisión, durante 4 o más horas al día, provocaba un aumento del índice de masa corporal, independientemente de la actividad física que realizaran [145], consecuencia reforzada positivamente por el hecho de que estar delante de la televisión induce a un aumento de la ingesta de alimentos [147]. De esta manera, el tiempo que pasa un individuo sentado al día está relacionado con un aumento de los niveles de PCR, IL-6 o TNF α [144, 148], así como la supresión de la lipoproteína lipasa (LPL) muscular y a una reducción de la absorción de la glucosa por el músculo esquelético, debido a la falta de estimulación contráctil inducida por el largo tiempo que se pasa sentado [147]. Respecto a la IL-6, se han observado aumentos mayores en aquellos individuos que dentro del propio sedentarismo son los más sedentarios, sugiriendo una clasificación de estos individuos como inactivos [144].

1.3 Respuesta inmunológica e inflamatoria a una sesión de actividad física

1.3.1 Respuesta inmunitaria a una sesión de actividad física

Toda sesión de actividad física con una combinación de duración e intensidad suficientemente elevada induce a una respuesta inmunitaria de fase aguda caracterizada, en general, por una disminución de la inmunidad innata y adquirida [149]. Por lo tanto, durante un período de tiempo variable, el organismo es más susceptible a sufrir infecciones, periodo conocido como *open window*, por la supuesta mayor facilidad para la entrada de microorganismos infecciosos en el organismo [150-152]. En general, esta respuesta se puede considerar que es proporcional a la duración e intensidad del ejercicio [149].

Durante este *open window*, se producen unas variaciones en el número de células del sistema inmunitario circulantes, con un incremento en el número total de leucocitos [153]. Este incremento es debido, principalmente, al aumento en el número de neutrófilos circulantes, aumento que puede caracterizarse como proporcional a la intensidad y duración del ejercicio [153, 154]. Este aumento en el número de neutrófilos se acentúa una vez finalizada la actividad (neutrofilia retrasada), de forma especial si la duración del ejercicio es superior a las 2 horas, o si el ejercicio ha provocado un grado

importante de daño muscular, con valores de neutrófilos circulantes similares, e incluso superiores, a los datos observados después de una infección [151]. Los factores que inducen esta neutrofilia incluirían el aumento de hormona de crecimiento, adrenalina, cortisol o IL-6 durante el ejercicio [150, 154-158]. Una de las características de esta neutrofilia posterior al ejercicio es la presencia de precursores de neutrófilos, células inmaduras y poco diferenciadas [151]. Excepto en los casos de ejercicios extremos, tras 24 h de haber finalizado la actividad el número de neutrófilos circulantes ya ha vuelto a valores basales [151].

En el caso de los linfocitos, la observación más general es una disminución después del ejercicio, sin embargo, hay que diferenciar si se trata de una actividad breve pero intensa o por el contrario, se trata de una actividad prolongada. El número de linfocitos aumenta durante una actividad física intensa y de corta duración, tendiendo a disminuir inmediatamente después de esta actividad. En el caso de una actividad física prolongada se observa una disminución por debajo de valores basales después de dicha actividad. En ambos casos se ha sugerido que la adrenalina y el cortisol juegan un papel importante, con una contribución predominante de la adrenalina, aumentando el número de linfocitos y, un papel esencial del cortisol, en la disminución del número de linfocitos después de ejercicios prolongados [151]. Estos valores suelen retornar a cifras basales al cabo de 4-6 horas de haber finalizado la actividad [151]. Adicionalmente, algunos estudios han observado apoptosis de los linfocitos después del ejercicio, sobre todo en ejercicios de intensidad moderada [159-161], lo que podría contribuir a la observación de números inferiores de células circulantes. En ejercicios más intensos, parece ser que la apoptosis podría ser debida a una reducción de los niveles de pH, al aumento de la expresión de macrófagos o al incremento de elementos como TNF α , IL-6 o PCR, aunque no todos los estudios concuerdan [159, 161-163]. De hecho, el estudio realizado por Krüger et al. [161] sugería que la apoptosis de linfocitos postejercicio es debida a un aumento de los niveles de cortisol y una reducción de Bcl-2, proteína anti apoptótica que se encuentra en la membrana intracelular. Otros estudios focalizados en subpoblaciones de linfocitos [164] han detallado que, los linfocitos que reducen su cantidad post ejercicio son los del tipo 1, aquellos que secretan IL-2, IFN γ y TNF α , y que son los responsables de la defensa contra patógenos intracelulares. Por el contrario, no se producen variaciones en los linfocitos tipo 2, los encargados de la defensa extracelular mediante la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13. Además, se ha sugerido que un ratio linfocito 1/linfocito 2 favorable para el segundo tipo, sería un indicador de mayor susceptibilidad de sufrir infecciones después del ejercicio [164].

Respecto a los monocitos, pese a que durante el ejercicio se mantienen en niveles estables, una vez finalizado, aumentan claramente [165]. Es importante considerar que después de la movilización de estas células, se observa un aumento en la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales del tejido del músculo esquelético, con la consecuente infiltración de leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia el intersticio muscular, donde se produce uno de los procesos clave de la respuesta inflamatoria al ejercicio, iniciando el proceso de reparación muscular [166]. De hecho, se ha observado como una reducción de los niveles de monocitos provoca un empeoramiento en los procesos de recuperación y reparación muscular [167].

Dentro de esta respuesta inflamatoria al ejercicio, como parte de la respuesta innata del sistema inmunitario, destacan los cambios que se producen en los niveles circulantes de citocinas, y que presentan similitudes y diferencias con los causados por una infección. Estudios previos observaron como la administración de *E. coli*, como organismo infeccioso, en personas sanas provocaba un aumento de 2-3 veces las concentraciones de TNF α [168]. En cambio, cuando dichas personas recibían la endotoxina y realizaban ejercicio en cicloergómetro los niveles de TNF α no aumentaban. Este hecho llevó a pensar que, a pesar de la similitud entre la respuesta a una infección y a la actividad física, las cascadas de citocinas eran diferentes, y en el caso del ejercicio parece estar mediada por la IL-6, la primera citocina en aparecer en respuesta al ejercicio. En este sentido, Ostrowski et al. [169] presentaron un modelo de respuesta inflamatoria al ejercicio según el cual una sesión de ejercicio de suficiente intensidad y duración provoca un incremento en los niveles circulantes, o sistémicos, de citocinas principalmente de carácter antiinflamatorio, con inhibidores de citocinas proinflamatorias que limitaban la magnitud y duración de la respuesta inflamatoria al ejercicio. De esta manera, la primera citocina en aparecer en circulación es IL-6, claramente la que aumenta más rápido y en mayor magnitud [102]. Le siguen IL-1ra y sTNF-R, para, a continuación, aumentar la IL-10, estos tres últimos elementos con características claramente antiinflamatorias. Adicionalmente pueden observarse incrementos de otras citocinas, como la IL-8 o la IL-12 [153, 170].

1.3.2 Respuesta de la IL-6 a una sesión de ejercicio: causas y efectos

En principio, se clasificó la IL-6 como una citocina proinflamatoria, pero posteriormente se propuso que la IL-6 también puede actuar como citocina con características antiinflamatorias, aunque este efecto antiinflamatorio se produce exclusivamente cuando el incremento de IL-6 es puntual y en concentraciones muy elevadas, no como en el caso de la inflamación sistémica crónica descrito previamente [171]. En estas condiciones la IL-6 podría inhibir la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF α [125, 152] y la IL-1 β [152, 154]. De hecho, como se ha comentado anteriormente, una de las diferencias esenciales con la respuesta a la infección es que las citocinas proinflamatorias, principalmente el TNF α , no aumentan en respuesta al ejercicio [102, 152], a menos que se trate de un ejercicio muy prolongado e intenso [153]. Por otra parte, se ha indicado que el aumento de IL-6 también estimula la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-1ra, sTNF-R y la IL-10, que ejercen su papel antiinflamatorio por medio de diferentes mecanismos [110, 125, 171-174]. Tanto por este efecto como por su efecto inhibidor de citocinas proinflamatorias, se propuso que la IL-6 es la principal responsable de que la respuesta inflamatoria se considere, a nivel sistémico, como antiinflamatoria. En relación con la estimulación de citocinas antiinflamatorias, Steensberg et al. [125] reportaron cómo tras una administración de IL-6 recombinante en sujetos sanos sin realizar ejercicio físico previo, reproduciendo el aumento de los niveles de IL-6 que se producen tras un ejercicio físico, se observaba el aumento de los niveles de IL-1ra e IL-10, confirmando el efecto antiinflamatorio que provoca el aumento de IL-6. Además, no aumentaron los niveles de TNF α . Zaldivar et al. [175], estudiaron los niveles de citocinas post ejercicio sin administrar ningún tipo de suplemento o sustancia recombinante. En este caso, el hecho de realizar 30 minutos de ejercicio físico a una alta intensidad sí provocó un aumento de niveles circulantes tanto de compuestos proinflamatorios (IL-1 α , TNF α , IFN γ) como antiinflamatorios (IL-10), además de IL-6 en monocitos y linfocitos, hecho que, siguiendo el modelo de Ostrowski y las afirmaciones de los autores, podría deberse a que en los primeros instantes de estrés post ejercicio, se producen aumentos de componentes tanto proinflamatorios como antiinflamatorios [175]. En ejercicios de corta duración y alta intensidad (12x60 segundos de cicloergómetro y entrenamiento de intervalos de alta intensidad (HIIT) de carrera a pie) también se han observado aumentos de TNF α [176, 177], indicando que el aumento de TNF α puede darse cuando la intensidad es especialmente elevada. En cualquier caso, los modelos de ejercicio tipo HIIT suponen un nuevo campo de estudio que resulta difícil de relacionar con las ideas generales de aumento de citocinas post ejercicio. A pesar de que la inhibición de las citocinas proinflamatorias anteriormente comentadas está regulada por IL-6, estudios en ratones

han demostrado que TNF α también está suprimido por una vía independiente a IL-6 [110]. En ratones knock-out de IL-6 se observó como los niveles de TNF α en respuesta al ejercicio eran muy bajos, hecho que ha sido relacionado con la acción de la epinefrina, aunque el mecanismo que lo relaciona sigue sin estar claro.

En esta respuesta inflamatoria, el incremento más destacado entre las distintas citocinas es el de la IL-6, que puede llegar a concentraciones 100 veces superiores a su valor en condiciones basales [102, 153]. Aunque se trata de una citocina pleiotrópica [178], lo que dificulta determinar su origen, se ha demostrado que el músculo esquelético activo es el principal productor de IL-6 durante el ejercicio [179, 180]. En este sentido, diversos estudios han establecido que la contracción muscular provoca un aumento muy rápido de la expresión del ARNm de IL-6 intramuscular, así como de su actividad transcripcional [169, 179, 181-183]. El mecanismo indicado podría deberse a la presencia de sitios de unión para NF-KB y factor nuclear de IL-6 (NFIL6) en la región promotora de IL-6, siendo el NF-KB activado por la presencia de ROS, productos formados tras el ejercicio físico [184]. Algunos estudios han demostrado como la suplementación con sustancias antioxidantes provocaría un menor aumento de IL-6 por disminución de la cantidad de ROS [184]. En relación con la contractibilidad del músculo esquelético y la síntesis de IL-6, la indometacina, miembro de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, es capaz de inhibir NF-KB, reduciendo el aumento de IL-6 mediado por la contracción muscular [184].

La magnitud del aumento de la IL-6, y su expresión en el músculo, vienen determinadas por la disponibilidad de glucógeno muscular. En ejercicios donde el glucógeno tiende a agotarse, el incremento de los niveles de IL-6 es exponencial, alcanzando los máximos niveles observados [102]. Este gran aumento tiene consecuencias sobre el metabolismo de la glucosa, debido a que los elevados niveles de IL-6 son una señal para el hígado para activar o incrementar el proceso de glucogenólisis, por su capacidad para inhibir la actividad de la glucógeno sintasa y aumentar la actividad de la glucógeno fosforilasa, liberando glucosa al torrente sanguíneo que será captada por el músculo esquelético [174]. Está bien establecido que la entrada de glucosa en el músculo depende de la acción que tenga la insulina sobre este tejido. En primer lugar, se une a los receptores tirosina quinasa transmembrana que conlleva una activación secuencial de un seguido de componentes como son IRS1, PI3K y Akt, concluyendo con la translocación de GLUT-4 que permite el paso de glucosa al músculo esquelético. En un estudio *in vitro* reciente con músculo de ratas [185], observaron una estimulación de la capacidad oxidativa de la glucosa independiente de la acción de la insulina. La administración de IL-6 provocaba una reducción de la

fosforilación de Akt mediada por insulina, pero las ratios de oxidación al músculo eran similares a las observadas en condiciones normales o con la administración de insulina y citocinas, conjuntamente, evidenciando que la IL-6 tienen la capacidad de estimular la captación de glucosa por parte del músculo y aumentar el metabolismo de la glucosa independientemente de la insulina. Estudios previos, realizados en biopsias humanas musculares, ya demostraron que una exposición de corta duración de IL-6 aumentaba también la entrada de glucosa, vía AMPK [186]. En el caso del estudio en cuestión, el hecho de que no se observen aumentos de entrada de glucosa puede deberse a la poca exposición de las citocinas (2 horas).

Cuando las reservas de glucógeno no se ven comprometidas, la magnitud del aumento de IL-6 depende de la intensidad y duración del ejercicio, con mayores aumentos para combinaciones superiores de estos parámetros del ejercicio [152, 154, 171, 174]. Algunos autores consideran la duración del ejercicio como el principal factor a tener en cuenta [110], a pesar de que se han observado aumentos de IL-6 en esprints (repeticiones de 5 segundos) en cicloergómetro [187], evidenciando que el aumento de IL-6 puede ser considerado multifactorial. En relación con la dualidad intensidad/duración, el estudio de Nieman et al. [188] observó un discreto aumento de los niveles plasmáticos de IL-6 y de leucocitos totales en mujeres habituadas a andar, que caminaron durante 30 minutos a una intensidad del 60-65% VO_2 máx, lo que contribuye a confirmar la observación de que ejercicios ligeros prácticamente no inducen un aumento de esta citocina ni, en general, la respuesta inflamatoria al ejercicio. De forma adicional, la magnitud del incremento de IL-6 puede verse influenciada por factores como la edad, el nivel del sujeto o el IMC [152].

La relación entre los niveles de glucógeno muscular y la respuesta de la IL-6 descrita previamente es un ejemplo de que el papel de las citocinas en el organismo no está únicamente relacionado con el sistema inmunitario, de manera que son importantes en multitud de procesos fisiológicos. La posible relación entre la IL-6 y el metabolismo energético en general, y su relación con la disponibilidad de glucógeno en particular, han sido ampliamente estudiadas. El protocolo utilizado por Keller et al. [189] se basaba en dos pruebas de extensor de rodilla separadas por dos semanas. El día antes de cada una de estas pruebas, los sujetos completaban un ejercicio aeróbico de 60 minutos de cicloergómetro o ergómetro de brazos. Al finalizar, recibían una recuperación con baja o alta cantidad de HdC. Los resultados mostraron que cuando se reducía la ingesta de HdC en un 40%, había una asociación también del 40% en aumento de la concentración de IL-6 en plasma post ejercicio. El mecanismo por el cual la depleción de los niveles de glucógeno induce a un aumento de la expresión de IL-6, en este caso, sigue sin

elucidarse, aunque los autores señalaron a la proteína fosfatasa 1 como una de las responsables [189]. Esto podría indicar que una de las funciones de IL-6 es la regulación de los sustratos energéticos para su consiguiente oxidación [174]. El estudio realizado por Nieman et al. [190] resulta bastante concluyente ya que observaron como la expresión de ARNm IL-6 mediado por la contracción muscular descendía tras la ingesta de glucosa, lo que permitía un ahorro de glucógeno. Por otro lado, los niveles plasmáticos de IL-10, IL-6 y IL-1ra también se veían reducidos, confirmando que los procesos transcripcionales que afectan al gen de IL-6, están mediados por el contenido de glucógeno, hecho que se ha ido contrastando en artículos posteriores [181]. En este sentido, Starkie et al. [191] ya demostraron como la ingesta de HdC (64 g), durante una prueba de 60 minutos de ciclismo o carrera, atenúa los niveles de IL-6 en plasma. Además de la comentada relación entre los niveles de IL-6 y el músculo esquelético, algunos estudios indican que incluso el cerebro podría favorecer su aumento [102]. En este caso, en dos pruebas de 60 minutos a diferente temperatura corporal (38°C y 39,5°C), con 60 minutos de recuperación entre pruebas, se observaron aumentos de IL-6 en ambos test, más marcados en el segundo [192]. Este aumento de IL-6 podría ser debido a que un incremento de la temperatura central provoca una mayor sensación de fatiga, y podría existir una relación entre fatiga central y niveles de IL-6. Además, el aumento de IL-6 sería producido por los astrocitos, siempre mediado por la adrenalina, acorde a los estudios ya comentados. Por último, la razón de que haya un mayor aumento, de hasta 5 veces los valores basales en el segundo test, podría deberse a que la corta recuperación entre pruebas obligaría a disponer de los procesos de glucogenólisis hepática para mantener la homeostasia de la glucosa, indicando, que un aumento de IL-6 mediado por el cerebro significaría un déficit energético sistémico [193].

Además de actuar sobre el metabolismo de la glucosa, también se ha asociado a la IL-6 la capacidad de activar la lipólisis [194], lo que también contribuiría a aportar sustratos energéticos para el músculo en esta situación de depleción de glucógeno, aunque el mecanismo intermediario no está claro. Estudios *in vitro* han observado aumentos de la expresión de UCP-1 y PGC-1 α tras la administración de IL-6 [195]. La administración de IL-6 recombinante provocaba un aumento de ácidos grasos libres en circulación, aunque la presencia de altas concentraciones de epinefrina, resultaba un punto dudoso sobre si el motivo de los AGL eran debidos a la acción de IL-6 o a la de la propia epinefrina, al ser un potente agente lipolítico [174]. En otro estudio con ratones [196], aquellos que presentaban déficit de IL-6 tenían mayor predisposición de ser obesos, comparados con los grupos control. Pero cuando los ratones con obesidad eran tratados con IL-6 durante un periodo de 15 días, se observaba una reducción de

su peso corporal, sugiriendo que la IL-6 está implicada en los procesos lipolíticos. En pruebas más extremas, como la estudiada por investigadores polacos [197], observaron que durante las 48 h que duraba la competición había una correlación entre niveles de IL-6 y niveles de ácidos grasos libres, glicerol y β -hidroxibutirato, evidenciando el papel de IL-6 como mioquina, citocina sintetizada y liberada por el músculo, durante el ejercicio físico. Por otro lado, en pruebas de alta intensidad y bajo volumen (repeticiones de 30 segundos con 3 minutos de descanso) [177], provocaron un aumento de ácidos grasos no esterificados como consecuencia del aumento de los procesos lipolíticos, necesarios para mantener la contracción muscular activada por la demanda de ejercicio, y en detrimento de los ácidos grasos libres.

1.3.3 Respuesta de la IL-10 a una sesión de ejercicio

La información en relación con la respuesta de la IL-10 al ejercicio es mucho más escasa, especialmente en relación con las células o tejidos que provocan su aumento durante el ejercicio. La IL-10 es considerada la citocina antiinflamatoria por excelencia [108], ya que inhibe la producción de factores proinflamatorios, como IL-1 β , TNF α o IL-1 α , en distintos tejidos, incluido el muscular [172, 198, 199]. Todos estos compuestos proinflamatorios desempeñan un papel crítico en la activación de granulocitos, monocitos/macrófagos, células NK o linfocitos B y T [102]. Su producción depende de macrófagos, linfocitos T_{2h}, células B y monocitos [200], y recientemente se ha observado su aumento y producción en el músculo esquelético [201], aunque no está claro qué tejido o tipo de célula es la responsable del origen del incremento de IL-10 durante el ejercicio. En este sentido, algunos estudios no atribuyen a las células sanguíneas mononucleares una contribución significativa en el aumento de los niveles plasmáticos de IL-10 durante el ejercicio [25, 202]. Tal como se ha indicado previamente, y de forma independiente a su origen, ciertos estudios atribuían el aumento de IL-10 a una acción directa por parte de IL-6 [125], aunque existen dudas sobre la concentración necesaria de IL-6 para estimular la liberación de IL-10. El aumento de IL-10, sumado al de la IL-1ra post ejercicio, es un claro indicador de las características antiinflamatorias del ejercicio físico [203], como mínimo a nivel sistémico. De forma similar a la IL-6, la magnitud del aumento de la IL-10 después del ejercicio depende de la intensidad y duración del mismo, aunque la duración parece ser el factor determinante [152, 153, 204] y los estudios en este sentido son escasos. En uno de ellos [205] no observan variaciones en los niveles circulantes de IL-10 en deportistas bien entrenados tras correr durante 1 hora al 60% VO₂máx, aunque en pruebas con un componente aeróbico más elevado, como pueda ser un maratón o medio maratón, y también en pruebas de 15 km,

la concentración de IL-10 una vez finalizada la competición sí se vio aumentada [25, 152, 153]. Sin embargo, la bibliografía [176, 177, 206] indica que sesiones de HIIT también aumentan la concentración de IL-10 postejercicio, atenuando la producción de factores proinflamatorios. Zwetsloot et al. [176] describieron un aumento inmediato de TNF α tras realizar 12 repeticiones de 60 segundos de cicloergómetro a máxima intensidad, pero los niveles de esta citocina proinflamatoria iban descendiendo a medida que aumentaba la concentración de IL-10, lo que podría confirmar el papel inhibitor de este componente sobre productos proinflamatorios. En pruebas también de alta intensidad, pero de carrera a pie [177], la tendencia fue la misma, siendo cada vez mayor la ratio IL-10/TNF α a lo largo del tiempo. En cambio, algunos autores como Verbickas et al. [187] no observan cambios en la concentración de IL-10, y no cuantificaron niveles de TNF α , como respuesta a 12 sprints de 5 segundos de duración en cicloergómetro ni a “drop-jumps”, hecho atribuible, según los mismo autores, a la poca duración del estímulo de ejercicio de alta intensidad, ya que, en general, se asume que la IL-10 no responde de forma inmediata al estímulo que supone el ejercicio.

1.3.4 Respuesta de otras citocinas a una sesión de ejercicio

Con relación a otras citocinas que aparecen en la respuesta al ejercicio, la IL-1ra es una citocina producida principalmente por macrófagos, y en menor medida por hepatocitos y monocitos [184]. La IL-1ra inhibe la citocina proinflamatoria IL-1, reduciendo su señal de transcripción, a través del receptor de IL-1, y su aumento depende de los niveles de IL-6 circulantes, tal y como se ha comentado al inicio del apartado [125, 174]. Algunos autores han observado aumentos de esta citocina hasta 3 h posteriores a la realización de ejercicio [207].

La IL-8 es un tipo de citocina cuya producción depende de la cantidad de masa muscular implicada. De esta manera, tras la realización de ejercicios como correr, su presencia es destacable, como marcan algunos autores [152, 153, 190, 208], pero no se encuentra en circulación tras ejercicios concéntricos como el ciclismo [170]. El estudio de Nieman et al. [190] observó que después de realizar 3 h de ejercicio en tapiz rodante se detectaban en plasma concentraciones de IL-8 que se correlacionaban con sus niveles de ARNm en el músculo esquelético activo. En cambio, en ejercicios sobre cicloergómetro, pese a también provocar un aumento de mensajero en el músculo, la presencia de IL-8 en plasma era nula [170], siendo sugerida para algunos autores la categorización de la IL-8 como mioquina [209]. Pese a que la función fisiológica de IL-8 sigue sin elucidarse, especialmente con relación al ejercicio, parece ser que esta citocina es capaz de atraer a los neutrófilos, y actuar como factor angiogénico [210].

La IL-12 es un heterodímero unido por puentes disulfuro con propiedades proinflamatorias [211], responsable de la inmunidad mediada por células, que consta de dos subunidades: 35 kDa (p35) y 40 kDa (IL-12 p40). La subunidad p40 de IL-12 actúa como citocina antiinflamatoria de manera indirecta, inhibiendo la acción de la IL-12. Además, esta subunidad es el factor limitante para la expresión de IL-12, siendo producida exclusivamente por células inmunitarias (en fagocitos mononucleares activos y células dendríticas) como respuesta a un aumento de AMPc [37]. La principal función de IL-12 es actuar como enlace entre el sistema inmune innato y el adaptativo, mediando en la diferenciación adecuada de las células CD4⁺ y regulando las funciones de distintos tipos de células efectoras [212]. Se ha observado un aumento en las concentraciones de la subunidad IL-12 p40 como consecuencia del ejercicio [205], independientemente de si se trata de un ejercicio puntual o de un programa de dos semanas de duración [213]. Sin embargo, no se ha estudiado en detalle la respuesta de la IL-12, ni de la subunidad p40, al ejercicio. Santos et. al [153] observaron un aumento en las concentraciones de IL-12 durante el periodo de recuperación de un maratón (24-72 horas posteriores), hecho atribuible al efecto de IL-10 e IL-6 sobre esta citocina.

1.3.5 Producción estimulada de citocinas *in vitro* en relación con el ejercicio

Está bien establecido que la capacidad que tienen los leucocitos, en sistemas *in vitro*, de producir citocinas en respuesta a un estímulo es un indicador importante y válido para evaluar la funcionalidad del sistema inmune, siendo uno de los aspectos que se ha ido estudiando dentro de la respuesta inflamatoria al ejercicio. El lipopolisacárido (LPS), como principal estímulo utilizado, es un componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que actúa como endotoxina para el ser humano, estimulando la respuesta de los monocitos [214]. El LPS activa los TLR tipo 4 en mamíferos, estimulando la producción, de forma directa o indirecta, de citocinas como TNF α , IL-6, IL-1, IL-10 y TGF β [207].

Esta técnica ha sido utilizada en algunas ocasiones para estudiar el efecto del ejercicio sobre la producción estimulada *in vitro* de citocinas. En este sentido, Abbasi et al. [207] realizaron un estudio en el que tras completar una media maratón se obtenían muestras sanguíneas, las cuales fueron incubadas con o sin presencia de LPS, durante 1 hora. Detallando algunas de las citocinas más representativas observaron un marcado descenso en la producción de TNF α en muestras estimuladas, no solo al haber finalizado la actividad, como también comenta Nielsen et al. [152], sino en las 24 horas posteriores, sugiriendo un efecto más duradero de la estimulación con LPS sobre esta citocina. Estos resultados, concuerdan con los realizados por Drenth et al. [215, 216]

quienes detallaron una reducción de la producción de TNF α tras la estimulación con LPS, tanto en distancias de 5 como de 65 km. En el caso de la IL-1ra, se da un aumento post ejercicio influenciado por la estimulación con LPS que se mantiene durante las 3 horas siguientes [207, 215, 216], incluso, en algunos casos, la expresión de ARNm de IL-1ra se mantuvo significativamente elevada hasta 24 h después de haber finalizado el ejercicio [207]. El caso de la producción estimulada de IL-10 es un ejemplo de la importancia de la estimulación, ya que con una estimulación de una hora [207], no se observó ningún cambio en los valores de esta citocina. Según los autores [207], este hecho es atribuible al escaso tiempo que estuvo la toxina con las muestras, dado que se ha detallado que para afectar a la IL-10 son necesarias entre 3 y 5 horas de incubación, dado que son procesos secundarios al aumento de las citocinas proinflamatorias [217], como el que observan Nielsen et al. [152] quienes sí obtuvieron mayores valores de IL-10 post ejercicio en las muestras estimuladas en comparación con las no estimuladas tras 6 horas de exposición a LPS. La IL-8, aumenta considerablemente tras la estimulación con LPS, en parte, por la capacidad fagocítica y bactericida que posee [207]. Sus niveles en el estudio de Nielsen et al., aumentaron un 242% tras la incubación con LPS. En otro caso [207], ya se observaron aumentos a los 30 minutos de haber finalizado el ejercicio, incrementándose a medida que aumentaba el tiempo de recuperación. A las 24 h de haber finalizado la actividad, los valores de ARNm seguían siendo elevados, pero no los de proteína, que descendían a niveles basales, sugiriendo alguna modificación post transcripcional que pudiera afectar a esta citocina [207]. Referente a la IL-6, los resultados, como veremos, están condicionados por el sexo. Con el fin de comparar estudios, se describirán los resultados obtenidos en hombres en las pruebas realizados por Nielsen et al. [152] y Abbasi et al. [207], quienes observaron que la incubación con LPS indujo a una reducción de los niveles de esta citocina tras la competición [152, 207]. Aun así, a los 30 minutos de haber finalizado la prueba, fue descrito un pico en los niveles de IL-6 [207]. En el caso de la IL-1 β , distintos estudios observan un aumento en muestras estimuladas durante el periodo de recuperación [152, 215], aunque no todos detallan este efecto [207], pudiendo estar también influenciado por la temporalidad de la estimulación.

Las producción de citocinas puede diferir entre sexos, debido a los cambios hormonales de las mujeres durante el ciclo menstrual [218], y al papel de los receptores de estrógenos sobre la producción de citocinas [140], hecho observable tras la administración de LPS [207]. De esta manera, se ha detallado una reducción en la concentración de IL-6 e IL-1ra en mujeres, en comparación con hombres, tras la realización de ejercicio e incubación con LPS [207]. El caso de IL-1ra, según los autores

[207], podría deberse a que la producción de esta citocina se inhibiría durante la fase lútea del ciclo menstrual, la mayoritaria en las mujeres del estudio. En cambio, la IL-8 podría aumentar en aquellas mujeres que se encuentren en la fase lútea. Los resultados de la IL-6 estuvieron claramente condicionados por el sexo [207]. Mientras que, en los hombres, se produjo un pico claramente marcado de IL-6 a los 30 minutos de haber finalizado la actividad, en las mujeres se da una tendencia progresiva a la baja a medida que pasa el tiempo de recuperación. Según otros autores [219], el motivo es que los estrógenos inducen a un descenso en los niveles de IL-6. En el caso del TNF α , existen diferencias entre estudios. Mientras Abbasi et al. [207], no detallaron diferencias entre sexos, otros autores, como Schwartz et al. [219], observaron que, en mujeres sin un estímulo deportivo previo, la producción de esta citocina durante la fase lútea, tras la estimulación con LPS, era menor.

1.4 Cafeína e inflamación

Existe una estrecha relación entre la cafeína y diferentes aspectos de las repuestas inmunitaria e inflamatoria en el organismo. Esta relación se basa en algunos de los mecanismos de acción de la cafeína que se han descrito de forma general en el apartado 1.1.3. Adicionalmente, también existen interacciones entre otros compuestos que suelen estar presentes conjuntamente con la cafeína en productos como el café, por ejemplo, compuestos fenólicos como los ácidos clorogénicos (ACGs), y los procesos inflamatorios en el organismo.

1.4.1 Mecanismos implicados en el efecto de la cafeína sobre la inflamación

Se ha propuesto que, principalmente, la cafeína modula el sistema inmune modificando los niveles de AMPc [27, 68, 220]. El AMPc es un potente inmunomodulador que inhibe la producción de componentes proinflamatorios, como el TNF- α y la IL-12 [37, 96], estimulando, por el contrario, la formación de factores antiinflamatorios como la IL-10 [221].

Considerando lo indicado previamente sobre los receptores de adenosina, en el apartado 1.1.3, la cafeína, actuando sobre los receptores A₁ o A₃, provocaría un aumento de AMPc, lo que llevaría a un potencial aumento de citocinas antiinflamatorias y una disminución de las citocinas proinflamatorias. Así, se ha relacionado el aumento de las concentraciones de AMPc con concentraciones superiores de IL-10 y con una inhibición de los niveles de IL-12 [221]. El aumento de las concentraciones de AMPc, provoca una estimulación en los fagocitos mononucleares activos y células dendríticas

[37], únicos productores de la subunidad antiinflamatoria p40 de IL-12, encargada de inhibir a la citocina del mismo nombre, tal y como se ha comentado anteriormente. Del mismo modo, este efecto inhibitor en la producción de citocinas proinflamatorias ocurre con TNF α , ya que altas concentraciones de AMPc inhiben su producción [221].

En los receptores tipo A₂, presentes en los leucocitos, entre otras células, el efecto de la cafeína provocaría una reducción en las concentraciones de AMPc [27, 220], produciendo un aumento de citocinas proinflamatorias y una disminución de las citocinas antiinflamatorias. Ambos procesos, actuarían a nivel local, dado que la respuesta inflamatoria en cada tejido dependerá del tipo de receptor mayoritario en ese propio tejido. No se conocen estudios que hayan observado en detalle cuál sería el efecto a nivel sistémico.

Otros mecanismos que contribuyen a explicar la relación entre cafeína y sistema inmunitario o inflamación serían la acción que tiene la cafeína sobre la adrenalina y el cortisol, aumentando sus concentraciones [222]. El aumento de las concentraciones de adrenalina mediadas por cafeína, tal y como se ha explicado anteriormente, tiene una base en la estimulación del SNC [46, 50], incidiendo en un aumento de la señal de salida de esta hormona o por estimulación de las glándulas suprarrenales. Una vez los niveles de adrenalina son elevados, la interacción de esta hormona con los receptores β -adrenérgicos inducirá a un aumento de los niveles de AMPc [49], provocando, como en el caso del antagonismo de los receptores de adenosina, procesos inmunomoduladores caracterizados por una mayor expresión de citocinas antiinflamatorias.

En el caso del cortisol, el propio hecho de que la cafeína provoque un aumento de sus niveles ya se considera un mecanismo antiinflamatorio *per se*, dado que se ha descrito que el cortisol tiene efectos antiinflamatorios [223]. Se ha establecido que el mecanismo por el cual la cafeína aumenta la concentración de cortisol se basa en la acumulación de AMPc en la pituitaria, el cual inducirá a una mayor expresión del gen del factor liberador de corticotropina, estimulando la producción de adrenocorticotropina y aumentando los niveles de cortisol [51].

Como se ha explicado en el apartado dedicado a los mecanismos de acción de la cafeína, existe otro proceso más en el que dicha sustancia ejerce una acción clave, que es la acción inhibitoria de la actividad acetilcolinesterasa, enzima que cataliza la hidrólisis de la acetilcolina, neurotransmisor que presenta como uno de sus efectos la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias [45]. Por lo tanto, la cafeína, inhibiendo esta hidrólisis permitiría mantener unos niveles más elevados de acetilcolina,

impidiendo el aumento de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 o TNF α [45, 224-226].

La mayoría de los estudios que relacionan cafeína con inflamación han sido realizados *in vitro*. Estudios iniciales indicaban que la cafeína ejercía un efecto antiinflamatorio cuando se administraba a células del sistema inmunitario, hecho relacionado con un aumento de AMPc. Dicho aumento, no podía deberse a un antagonismo de la cafeína con los receptores de adenosina, ya que como se ha comentado anteriormente, el efecto de la cafeína sobre los receptores A_{2a} es disminuir los niveles de AMPc. Por lo que el mecanismo predominante era la inhibición de la fosfodiesterasa [220], a través del cual sí hay una elevación en los niveles de AMPc. Este mecanismo es adecuado para explicar el efecto de concentraciones de cafeína superiores a las fisiológicas, ya que la inhibición de las formas conocidas de la fosfodiesterasa se produce en este rango superior de concentraciones [27, 42-44]. Sin embargo, debido a estas elevadas concentraciones, estos resultados no serían extrapolables a modelos *in vivo*.

En relación con este efecto *in vitro* de la cafeína, la capacidad de ésta para inhibir la producción estimulada por LPS de factores proinflamatorios como el TNF α (uno de los factores proinflamatorios clave) o la IL-12, ha sido estudiado, así como inducir en la producción de una de las interleucinas antiinflamatorias más importantes como es la IL-10 [220]. Además, la cafeína puede inhibir la proliferación de linfocitos y macrófagos, *in vitro* [37, 96]. El estudio de Horrigan et al. [96] tenía como objetivo analizar los efectos de la administración de cafeína o paraxantina en cultivos de células de sangre humana estimuladas con LPS durante 24 h. Los resultados tras la incubación fueron que no se observaba ningún efecto sobre IL-10, IL-1 β e IL-12 pero a concentraciones de 100 μ M de cafeína, la producción de TNF α era suprimida. En relación con lo descrito en anteriores apartados, concentraciones de 100 μ M de cafeína corresponden a valores superiores a los fisiológicos. En el caso de la paraxantina, se observó una reducción de la producción de TNF α , pero no fue estadísticamente significativa. Aunque el estimulante más utilizado ha sido el LPS, otros estudios han usado otros estimulantes en sus protocolos *in vitro*, como *S. pneumoniae* o concanavalina A, pero siempre con concentraciones de cafeína por encima de los valores fisiológicos [220].

Siguiendo modelos de estudio similares, se han evaluado las propiedades antifibróticas de la cafeína, en el pulmón, actuando sobre dos tipos de células distintas: los fibroblastos y las células epiteliales, mediante la inhibición de TGF β [227]. En el hígado, también se ha observado un descenso de actividad fibrótica tras el tratamiento

de hepatocitos *in vitro* con cafeína, hecho también mediado por la reducción de la expresión de TGF y por la reducción de la expresión y deposición de colágeno [227].

Otro efecto que ha demostrado la cafeína en estudios *in vitro* es la capacidad de actuar sobre la acumulación de lípidos en los adipocitos, a través de la estimulación intestinal de células epiteliales (Caco-2). La supresión de la adipogénesis que se produce va en paralelo a una reducción de la expresión de la interleucina proinflamatoria IL-8 [228]. Por lo tanto, la cafeína, inhibiendo la acumulación de lípidos en los adipocitos, provocaría un efecto antiinflamatorio, ya que evitaría la liberación de citocinas proinflamatorias, como la IL-8.

1.4.2 Efectos de la cafeína sobre el estado inflamatorio del organismo

A pesar de que los mecanismos de actuación de la cafeína indican que podría tener un efecto sobre el estado inflamatorio del organismo, no son muchos los estudios que han realizado investigaciones en población general sobre cómo afecta una única toma de cafeína sobre marcadores inflamatorios e inmunitarios. Estos estudios [229-231] realizaron protocolos diferentes, pero con un patrón de toma de cafeína como similitud. El estudio de Alexopoulos et al. [229] se realizó en personas con sobrepeso. 14 personas, hombres y mujeres, recibieron 6 g de té verde o 125 mg de cafeína. Se determinaron los valores de componentes inflamatorios a los 30, 60 y 120 minutos tras la toma de las dosis, sin observar ninguna diferencia en IL-6 y PCR entre los grupos suplementados y el grupo control. Shechter et al. [230], únicamente dividieron a los 40 sujetos, mayoritariamente hombres, en dos grupos. El grupo control y el suplementado, el cual recibió 200 mg de cafeína. Después de 1 h tras la toma, se extrajeron las muestras sanguíneas. No se observaron cambios entre grupos ni en la adiponectina ni en la IL-10, pero sí hubo efecto de la cafeína en la PCR, disminuyendo su concentración. Por último, Ramakers et al. [231] realizaron una estimulación con LPS de *E. coli in vivo*. Los sujetos, 20 hombres sanos, recibieron 4 mg cafeína/kg peso o una solución salina, y, al cabo de 10 minutos, se les inyectó el estimulante a una concentración de 2 ng/kg peso. Durante 8 h, se fueron determinando marcadores inflamatorios (TNF α , IL-6 e IL-1ra) para su posterior estudio, y, pese a que el LPS provocaba una concentración más elevada de citocinas pro y antiinflamatorias, no hubo diferencias entre grupos en cuanto al efecto de la cafeína.

Es decir, la única variación conocida en cuanto al efecto de la cafeína sobre marcadores inflamatorios tras una única toma se observa en relación con la PCR, la cual disminuye su concentración, al menos en población sana.

El resto de los estudios que se han realizado para determinar el efecto de una dosis de cafeína sobre el estado inflamatorio se han centrado en estudiar el efecto de dicha suplementación sobre la respuesta inflamatoria en una sesión de ejercicio.

1.4.3 Cafeína y respuesta inflamatoria a una sesión de ejercicio

Uno de los modelos que se ha utilizado para el estudio del efecto de la cafeína sobre la respuesta inflamatoria en el organismo es el de la actividad física puntual. Estos estudios, de forma general, analizan cómo influye la suplementación con cafeína previa a una sesión de ejercicio sobre la respuesta inflamatoria. En este sentido, la cafeína puede ejercer una influencia importante sobre la respuesta inmunoendocrina al ejercicio, principalmente mediante la modulación de los niveles de catecolaminas y AMPc, como mecanismos más evidentes. Tanto es así, que el mayor incremento de los niveles circulantes de adrenalina es un resultado común cuando se evalúan los efectos de la cafeína en el ejercicio [24, 154, 156, 232, 233], al igual que el aumento de AMPc [220, 221].

En un estudio realizado por Tauler et al. [24] se observó que la suplementación con cafeína (6 mg/kg de peso), previa una prueba atlética de 15 km provocaba un mayor aumento en los niveles de IL-6 y IL-10. Pese a observarse incrementos de la IL-6 en respuesta al ejercicio, estos son menores a los determinados por otros estudios [156, 234, 235]. La razón radica en que el único estímulo que induce a un aumento en la concentración de IL-6 en este tipo de pruebas es la contracción muscular [179]. Pruebas de una duración aproximada de 1 h, en sujetos entrenados y con alta capacidad oxidativa, no dependen de que sus músculos utilicen glucógeno como principal fuente energética [24], siendo la falta de glucógeno un estimulador para la producción de IL-6 [189]. Dentro de estos incrementos inferiores, se observó como el aumento de la concentración de IL-6 en el grupo de deportistas suplementados con cafeína era superior al que se observaba en el grupo placebo, al igual que muestran otros autores [69].

Respecto a la IL-10, Tauler et al. [24] observaron que los niveles plasmáticos de esta citocina aumentaban más en el grupo suplementado con cafeína que en el grupo control [24], hecho que podría ser mediado por la IL-6, ya que se ha mostrado que dicha interleucina induce a la producción de IL-10 [125]. Cabe resaltar que este efecto, en general, se ha demostrado con concentraciones de IL-6 más elevadas que las determinadas en el estudio en cuestión [125], aunque no se ha descartado que también se dé con incrementos inferiores. Otros estudios [69], que sí remarcan un mayor

aumento de IL-6 tras la toma de cafeína, no observan diferencias en cuanto a la IL-10. Por otra parte, cuando se analizaron los resultados en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), no se observó ningún efecto de la cafeína [25]. En estas células, donde los receptores mayoritarios de adenosina son los A_{2a} , el efecto esperado de la cafeína sería una menor producción de AMPc. Aun así, los autores obtienen unos niveles de AMPc similares entre grupos indicando que no había efecto adicional por parte de la cafeína en los receptores A_2 de las PBMCs o a la existencia de otros mecanismos que llevaran a que los niveles de AMPc fueran similares en los dos grupos. En consonancia con la falta de efecto de la cafeína sobre los niveles de AMPc e IL-10 en PBMCs, tampoco se han observado efectos de la cafeína en los niveles plasmáticos y en PBMCs de IL-12p40, cuya producción está medida por el AMPc [37].

Ferreira et al. [69, 235] mostraron como el incremento de IL-6 e IL-10 es igual en aquellas personas que han tomado cafeína (5 mg/kg) o no, produciéndose un pico máximo de IL-6 e IL-10 a los 45 minutos de haber finalizado el ejercicio. Cabe resaltar que, en este caso [235], el ejercicio no era de larga duración, sino que consistía en 13 repeticiones de un ejercicio breve de gran intensidad (30 segundos sprint+15 segundos recuperación) que se fueron repitiendo en 6 sesiones repartidas en 2 semanas. Mientras, cuando se realiza una sesión de fuerza (4 series del máximo número de media sentadillas al 80% del peso máximo que un sujeto puede levantar en una repetición), la toma previa de cafeína (5mg/kg) sí provoca un mayor aumento de IL-6 post ejercicio [236], resultado que difiere de la afirmación comentada anteriormente en la que ejercicios de corta duración no se modifican los valores de IL-6 tras la administración de cafeína. En el caso de Ferreira et al. [235], los autores sugieren que la falta de diferencias entre grupos podría deberse a que se daba la posibilidad de tomar una taza de café en aquellos días en los que no había prueba.

En estudios con animales, cabe destacar el realizado por Vieira et al. [237] con ratas entrenadas (natación) durante un período de 6 semanas en las que se les administraba cafeína vía oral mientras se realizaban sesiones de HIIT. La hipótesis de los autores era que se produjera un aumento de IL-6 debido a la contracción muscular, pero también mediado por ROS a través de la vía del NF-KB. Efectivamente, se produjeron mayores niveles de IL-6 tras la realización de ejercicio, pero estos valores iban disminuyendo en aquellos grupos que habían ingerido cafeína (4 mg/kg o 8 mg/kg). Los niveles de IL-10 fueron aumentando entre grupos a medida que la concentración de cafeína era mayor, debido, posiblemente a un aumento en la producción de IL-10 por parte del músculo esquelético, mediado por un incremento en la concentración de AMPc. Además de provocar cambios en los niveles de citocinas, la ingesta de cafeína

favoreció la actividad de los receptores glucocorticoides, debido a un aumento de la hidrólisis de ATP en las ratas entrenadas y suplementadas.

Uno de los aspectos que se ha estudiado con relación al efecto de la cafeína, sobre lo estudiado con relación al efecto de ésta sobre la respuesta inmunitaria al ejercicio, es su efecto sobre la modificación del número de leucocitos circulantes. En este sentido, habitualmente se ha observado un aumento en el número de leucocitos circulantes después del ejercicio respecto a condiciones basales, con un mayor efecto en el caso del consumo de cafeína [24, 25]. Este mayor aumento de leucocitos después del ejercicio, en deportistas suplementados con cafeína, se debe principalmente a un mayor aumento del número de neutrófilos. Aunque estas diferencias en el número de neutrófilos ya se observan inmediatamente después del ejercicio [25], son más marcadas después de dos horas de recuperación [24]. Se ha propuesto que estas diferencias entre grupos fueron mediadas por los mayores niveles de cortisol y adrenalina, o incluso de la propia IL-6, inducidos por la cafeína, ya que estos elementos juegan un papel relevante en la movilización de neutrófilos hacia la circulación [155, 156]. Otros autores no han observado diferencias en estos valores, lo que podría ser explicado por la diferente duración del ejercicio y del periodo de recuperación considerados [157]. En cuanto a los linfocitos circulantes, Walker et al. [157] observaron un aumento en sus niveles tras la ingesta de cafeína. Por el contrario, en los estudios de Tauler et al. [24, 25] no se observó ningún efecto de la cafeína, lo que podría estar relacionado con la menor duración del ejercicio. Volviendo al estudio de Vieira et al. [237], los autores observaron tanto una neutrofilia como una linfocitosis, asociada, según ellos, a las sesiones de elevada intensidad. Estudios de simulación de partidos de fútbol americano [238] observaron un efecto sinérgico sobre parámetros inmunitarios, como el número de linfocitos, tras la toma de cafeína (5mg/kg peso). El efecto del ejercicio sobre el número de linfocitos producía un aumento del 38% de éstos, mientras que, tras la ingesta de cafeína, el aumento del número de linfocitos era de un 35% adicional, sugiriendo que la cafeína aumenta la actividad inmunológica, por un incremento en la movilización de los linfocitos.

1.4.4 Relación entre café, inflamación y salud

Los estudios de suplementación descritos en los apartados anteriores utilizaban una única dosis de cafeína como suplemento. Cuando se han querido estudiar los efectos sobre el estado inflamatorio del organismo de una suplementación de cafeína más prolongada, se ha usado el café como forma de suplementación o, mayoritariamente, se ha optado por analizar los efectos de la ingesta habitual de cafeína

a partir de los alimentos que la contienen, principalmente de café. Sin embargo, cuando se utiliza el café como suplemento, o se analizan los marcadores de inflamación en función de la ingesta de café, no se puede olvidar que el café contiene muchas más sustancias que la cafeína, siendo, los ACGs, una de las más importantes.

1.4.4.1. Ácidos clorogénicos

Como se ha comentado al inicio de este trabajo, el café es una de las bebidas más consumidas en el mundo, siendo la principal fuente de polifenoles en la mayoría de regiones europeas [239]. Estos polifenoles, denominados ACGs han sido estudiados en los últimos años en relación con sus posibles efectos beneficiosos para la salud.

Los ACGs son un conjunto de compuestos fenólicos con grupos hidroxilo en carbonos vecinos de sus residuos aromáticos que derivan de la esterificación de ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico y *p*-cumárico) con ácido quínico [240]. En la naturaleza se encuentran en las paredes celulares de multitud de plantas donde cumplen funciones de formación de lignina, protección contra microorganismos, luz ultravioleta, daño por herbívoros o daños físicos [241]. Por lo tanto, en la dieta humana las fuentes mayoritarias de ACGs son hortalizas y frutas, además del café como fuente principal [241].

Los ACGs se encuentran en el café en forma de mono y di-ésteres, encontrándose más de 40 tipos distintos, los cuales difieren en las sustituciones en grupos de isómeros en las posiciones 1, 3, 4 o 5 del ácido quínico [241], siendo el más abundante el ácido 5-cafeolquínico (5-ACQ) [242], que representa valores de entre el 76-84% del total de los ACG y siendo el grano de café, la planta con mayor concentración de ACGs (6-12%) [243]. A pesar de que en el grano de café la concentración de ACGs es muy elevada, las pérdidas producidas en el procesado industrial del café, sobre todo en el tostado, provocan reducciones importantes en su concentración. De media, podemos encontrar cantidades de 35 mg de ACGs/100 ml de café [244], los cuales pueden variar dependiendo del tipo de grano de café del que proceda (*Coffea arabica* o *Coffea canephora*) y de la temperatura a la que haya sido tratado; ya que a mayor temperatura la cantidad de ACGs es menor, mientras que la de cafeína se mantiene estable [245]. Además, la manera en la que se prepare el café también influye en las cantidades de ACGs. Se ha observado que las cantidades de ACGs por taza son mucho mayores en el café expreso preparado habitualmente en España en comparación con el que se prepara en Italia o Escocia, pudiendo ser debido

a que en España se prepara más “largo” [245], por lo que podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de analizar sus propiedades para el ser humano.

Entre las propiedades biológicas más relevantes de los ACGs se encuentran la antibiótica, antioxidante y antiinflamatoria [240], así como hipoglucémica e hipolipidémica [246]. La importancia de los procesos hipoglucémicos radica en el hígado, donde se encuentra mayoritariamente la glucosa-6-fosfatasa, enzima clave en el mantenimiento de la glucemia dado que se encarga de la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato a glucosa y fosfato [16]. Niveles anormales de esta enzima son los causantes de un aumento de la glucemia, a través de mayor producción de glucosa por parte del hígado, proceso que puede ser mediado por los ACGs, los cuales actúan inhibiendo la glucosa-6-fosfatasa, más eficientemente que la propia cafeína, evitando estos picos glucémicos [16].

Sin embargo, la mayor parte de estudios realizados con ACGs intentan relacionar estos compuestos con sus posibles efectos antioxidantes y/o antiinflamatorios. Mayoritariamente, el campo de estudio se centra en modelos de animales o estudios *in vitro* y no siempre con células humanas.

La base de los estudios sobre la actividad antioxidante de los ACGs es la capacidad de los ACGs para ceder átomos de hidrógeno a fin de reducir los radicales libres e inhibir las reacciones de oxidación [240]. Aun así, como ocurre con otros antioxidantes como la vitamina C, los compuestos fitofenólicos (ácido cafeico y ACGs) tienen actividad pro-oxidante cuando se encuentran con iones metálicos con actividad redox (principalmente Fe y Cu), formando ROS que pueden oxidar y degradar el ADN o compuestos lipídicos [240].

La actividad antioxidante del 5-ACQ se ha estudiado en cultivos celulares [240], observándose como protege contra la acción oxidante del H_2O_2 en células HaCaT humanas [247], y suprimiendo la formación de ROS en las células madre mesenquimáticas de la médula ósea, activando la fosforilación de Akt, y aumentando la expresión de FOXO [248]. Las ROS también pueden provocar un daño en el ADN. En el caso de los linfocitos humanos, se ha detallado una disminución del daño oxidativo en su ADN a casi la mitad, en presencia de ACGs, cuando es causado por radiación X o ultravioleta [240]. En cuanto a la dosis usada, en pocos estudios se usan cantidades fisiológicas de ACGs, ya que la mayoría las usa en concentraciones más elevadas que las que se observan en sangre después de la ingesta de cantidades incluso elevadas de ACGs. En estos casos, modelos de ratas con enfermedades crónicas, o en las que se ha inducido una situación de estrés oxidativo, son los modelos de estudio más

usados. En ellos, se administra el 5-CQA de forma oral, aunque las concentraciones varían entre estudios. Los resultados muestran, en general, una reducción en marcadores de oxidación y una prevención en la formación de eritemas inducidos por radiación ultravioleta [240].

Los estudios que relacionan los efectos de la administración de ACGs sobre el nivel de inflamación son escasos y, además, tal como se ha indicado previamente para otros estudios, no todos usan concentraciones fisiológicas de ACGs. La base de los estudios *in vitro* es analizar el efecto de los ACGs sobre distintas células que ya están tratadas con otro compuesto que puede generar una respuesta inflamatoria (LPS o distintas citocinas proinflamatorias) y observar su efecto antiinflamatorio. Shin et al, demostraron que los ACGs, en concentraciones del orden de mM, tienen un efecto antiinflamatorio en células humanas epiteliales por un descenso en la producción de IL-8 [249]. Otro estudio demostró que la administración de té con ACGs provocaba un descenso de la producción de IL-8, IL-6 en células Caco-2 estimuladas con LPS, TNF α e IFN γ [240]. Hwang et al. [250] realizaron un estudio con células de la glía y macrófagos de murinos estimulados con LPS, observando un descenso en la producción de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-6), y una inhibición de NO debido a la presencia de ACGs. Además, los ACG inhibieron la translocación nuclear del NF- κ B, uno de los principales factores involucrados en el proceso inflamatorio [16]. Las células se trataron con LPS (1 μ g/ml) y con ACGs (5-CQA) a diferente concentración (0, 2, 5, 20 μ M). Esta inhibición del NF- κ B parece ser un punto clave en el que se debe profundizar para estudiar cómo son inhibidos los componentes proinflamatorios mediados por esta vía. En PBMCs, se ha observado una reducción en las concentraciones de TNF α e IL-6 tras la administración de ACGs [251].

Estudios con modelos animales, con patologías como diabetes, artritis o problemas hepáticos, han detallado como la administración de 10-60 mg ACGs/kg peso durante periodos de una a dos semanas pueden ejercer un efecto antiinflamatorio similar al observado *in vitro* [240], por ejemplo, estimulando la producción de IL-10 e inhibiendo la de IL-12 en ratas [251]. La reducción en la expresión de TNF α , IL-6 e IL-1 β también ha sido observada en ratas a las que se les administraron 60 mg ACGs/kg peso, según los autores por inhibición de las vías NF- κ B y TLR [252]. En estos casos, el 5-CQA fue el tipo de ACGs usado.

Los estudios en los que se ha analizado el efecto de la administración de ACGs en humanos han sido realizados en población con alguna patología previa. Se han realizado estudios en personas con obesidad, diabetes, hipertensión o síndrome metabólico, observando mejoras en los marcadores propios de cada enfermedad [253].

Un mayor gasto energético postprandial fue descrito por Soga et al. [254] tras la ingesta diaria durante 4 semanas de un preparado con 329mg de ACGs. En diabéticos, la relación entre el efecto del café y el descafeinado ha sido analizada. Pese a que en ambos grupos se observó un descenso en el polipéptido insulino-trópico dependiente de insulina (GIP), los valores de secreción de GLP-1 aumentaron más tras la ingesta del café descafeinado, indicando un efecto antagonista de los ACG en el transporte de glucosa [255]. Dosis de 50 mg ACGs/kg peso durante 28 días en personas con hipertensión son suficientes para reducir la presión sistólica y diastólica en el orden de 4,7 y 3,2 mm Hg, respectivamente [253]. Incluso en personas sanas, el consumo de 400 mg de ACGs también provoca una reducción en la presión arterial [253]. En relación con la actividad física, el estudio de Nieman et al. [239] analizó el efecto de la administración diaria de café con alto contenido de ACGs (1066 mg ACGs vs 187 mg ACGs), además de cafeína (474 mg vs 33 mg), durante 2 semanas sobre el estado inflamatorio y el rendimiento en ciclistas mediante un test de 50 km contrarreloj. Al finalizar la prueba, no se observaron efectos de los ACGs en ninguno de los parámetros medidos ni de inflamación ni de rendimiento deportivo.

1.4.4.2. Ingesta de café y estado inflamatorio del organismo

Cuando se analizan los efectos del consumo habitual de cafeína, resulta imposible no considerar el consumo de café, como principal fuente de cafeína en la mayoría de países [7], incluido España, así como el posible efecto de otras sustancias que se encuentran en el café y otras fuentes de cafeína, principalmente los ACGs descritos previamente. De hecho, los ACGs han cobrado la suficiente relevancia como para ser el foco de atención principal en muchos de los estudios en los que se realiza una suplementación con café o se estudian los efectos de su consumo habitual. En esta sección se considerarán los estudios que siguen estos diseños, analizando marcadores de inflamación y también, por la estrecha relación entre los procesos, marcadores de oxidación, además de las posibles consecuencias sobre la salud.

La mayor parte de los estudios que han realizado protocolos de media o larga duración de ingesta de café han estudiado sus efectos sobre, principalmente, tres marcadores inflamatorios: adiponectina, PCR e IL-6. La adiponectina es una proteína que se expresa exclusivamente en los adipocitos y cuyos bajos niveles en plasma se han relacionado con acumulación de grasa corporal, obesidad, y en definitiva, un mayor riesgo de inflamación [106]. Kempf et al. [256] realizaron un estudio durante 3 meses con un incremento progresivo de la toma de café en personas con riesgo potencial de sufrir DM2. De este modo, durante el primer mes tomaban 1 taza al día, en el segundo

mes 4 tazas al día y en el último mes, 8 tazas al día, considerando una taza como 150 ml de café. La preparación del café era realizada por las propias personas en su casa, con su máquina de café. Al inicio del estudio, y mensualmente, recibían un paquete con 500 g de café con el que realizar los preparados y se les permitió mantener el café elaborado en termos. Los resultados mostraron como al acabar el periodo de estudio, los niveles de adiponectina eran mayores que al inicio del estudio. En este sentido, los aumentos de adiponectina normalmente se ven afectados por la ingesta de café, siendo un factor que normalmente se ve alterado, como en el estudio de Wedick et al. [257], donde observaron como la toma de 5 cafés al día durante 8 semanas provocaba aumentos de adiponectina, aunque las personas estudiadas presentaban sobrepeso, al igual que en otro estudio [258], en el que también se observó un aumento en los niveles de adiponectina en sujetos con $IMC > 27 \text{ kg/m}^2$, tras 3 meses de ingesta de café. En este caso, el aumento de adiponectina solo se dio en aquellas que habían tomado café “medio tostado”, más rico en ACGs que el café “altamente tostado”. Saito et al. [259], también observaron un aumento de adiponectina en aquellos sujetos sanos que habían consumido durante 2 semanas café en vez de té, pudiendo estar implicados los ACGs. Contrariamente a lo establecido, otros estudios que han seguido dosis similares (café con 3 mg cafeína/kg) no han encontrado cambios significativos en parámetros inflamatorios [260-262]. Como se observa en los estudios descritos, el aumento de la adiponectina es un hecho que está altamente relacionado con la administración de cafeína, pero cuya variación depende de que se tomen cantidades elevadas de café o cafeína (4 cafés o más de 600 mg cafeína al día), observándose también un mayor efecto en poblaciones con sobrepeso. El mecanismo que relaciona ambos componentes está mediado por PPAR γ , estimulador del aumento de niveles de adiponectina en plasma, debido al efecto que tiene la cafeína sobre este receptor [263]. En este mecanismo, la cafeína, actuando conjuntamente con TGF β , ejerce como activador de la expresión de PPAR γ , debido a los efectos inhibitorios que tiene sobre el factor de crecimiento CTGF en los hepatocitos [263].

La PCR es otro marcador de inflamación que es influido por la ingesta de café, aunque, como en el caso de la adiponectina, con variaciones entre estudios. El índice de masa corporal (IMC) parece influir en el efecto del café, dado que distintos estudios que observan efectos antiinflamatorios del café se realizaron en personas con bajo IMC [264-266], siendo este dato un factor clave. En el estudio de Kempf et al. [256], ya se ha comentado anteriormente como en periodos de 3 meses de ingesta de café no se observaron incrementos significativos en los niveles de PCR. Estos resultados concuerdan con estudios similares [257, 258, 262], siendo un patrón común el

sobrepeso de las personas participantes. Incluso las dosis, de más de 4 tazas de café diarias se asemejan entre estudios, que difieren en su duración, 8 [257] o 12 semanas [262]. Una reciente revisión [267] concluye que de forma general, no se puede establecer una asociación entre consumo de café y niveles de PCR, a pesar de que algunos estudios individuales sí observan dicho efecto, incluso uno de ellos [265], detectó una disminución de PCR tras la toma de café descafeinado, indicando un papel por parte de los ACGs. Cuando en vez de café se consume cafeína los resultados tampoco son convincentes. Bloomer et al. [268] no observaron ningún cambio en los niveles de PCR en sujetos sanos tras la ingesta de entre 250-500 mg cafeína al día durante 12 semanas.

En cuanto a la IL-6, también observamos resultados dispares. Wedick et al. [257] sí encontraron un aumento de la citocina tras 2 meses de consumo de 5 tazas de café diarias en hombres y mujeres con sobrepeso, en cambio, otros autores [256, 260] no detallan este efecto. En el caso de Gavrieli, et al. [260] la ingesta diaria de 200 ml de café (con 3 mg cafeína/kg peso) se realizó durante 2 semanas, exclusivamente en hombres con sobrepeso. Como ya se ha comentado anteriormente, en el estudio de Kempf et al. [256] se realizó un protocolo progresivo de ingesta de café de 3 meses de duración, ingiriendo 8 tazas de café al día en el último mes. En este caso, las personas eran hombres y mujeres con sobrepeso u obesidad.

En general, los resultados mostrados no permiten llegar a una conclusión inequívoca, en parte por las diferencias en los protocolos de estudio, ya que, además del tipo de población estudiada, el tipo de café que se administre (descafeinado, mayor o menor rango de tueste de los granos de café), el modo de preparación (filtrado, expreso, instantáneo) o la cantidad pueden influir en los resultados.

Por su estrecha relación con la inflamación, también se han analizado los efectos de la suplementación con café sobre el estrés oxidativo, tanto sobre las defensas antioxidantes, principalmente las enzimáticas, como sobre marcadores de oxidación. En este sentido, diferentes estudios han observado cambios positivos con relación a evitar el estrés oxidativo. Correa et al. [269] observaron un aumento del 52% de la actividad superóxido dismutasa (SOD), del 62% en la glutatión peroxidasa (GPx) y del 13% en la catalasa (CAT) en aquellos sujetos que consumieron 150 ml de café al día durante dos semanas. Kotyczka et al. [270] usaron dos tipos de café muy tostado, uno con alto contenido en ACG y otro con escaso contenido. Los resultados después de las tomas con café rico en ACG mostraron un aumento de la actividad SOD, GPx y CAT del 12, 25 y 22%, respectivamente. En cambio, con el café pobre en ACG se observó un descenso en los valores de SOD y GPx.

Dos estudios han relacionado el consumo de café con la actividad de la glutatión reductasa (GSR) y de la glutatión S transferasa (GST), cuyos niveles fueron más elevados tras el consumo de café [271]. El daño proteico y lipídico es otro tipo de característica del estrés oxidativo. Usando como biomarcador la 3-nitrotirosina, componente relacionado con enfermedades coronarias, se ha observado un descenso del 16% en sus niveles tras el consumo de café durante 4 semanas [272]. Otros autores [271] no observan dicho efecto, pudiendo deberse a la cantidad de ACGs presentes en el café, dado que los procedimientos de preparación difieren entre estudios. Los objetivos para reducir la peroxidación lipídica se centran en una reducción de los niveles de malondialdehído (MDA) y de la oxidación de las LDL. Aunque no todos los autores observan mejoras tras la ingesta de café, Yukawa et al. [273] sí reportaron una reducción en los biomarcadores de daño lipídico tras la ingesta de 3 tazas de 150 ml de café al día durante una semana.

1.4.4.3 Café y salud

Tal y como se ha comentado en el primer apartado, datos de la EFSA y de la FDA indican que el consumo de hasta 400 mg de cafeína al día no va asociado ni con problemas cardiovasculares, de toxicidad, del balance de calcio, cambios en el comportamiento, incidencia de cáncer ni efectos negativos sobre la fertilidad [10]. Lo que sí que puede provocar en ciertas personas, incluso en dosis relativamente bajas (100 mg) son efectos a corto plazo o que desaparecen al cabo de unas horas y que, en una persona sana, no supondrían ningún riesgo, como pueden ser la elevación de la presión arterial o un aumento de los niveles de alerta y de concentración [10], y que no deben ser confundidos con los efectos adversos, que serían aquellos que causan una anomalía de su funcionamiento poniendo en riesgo la calidad de vida del individuo. Entre estas alteraciones, distintos estudios clínicos y meta-análisis indican que el consumo puntual de café o cafeína puede favorecer la resistencia a la insulina, así como un aumento de los niveles de glucosa en sangre y elevación de la concentración de epinefrina [261], debido al bloqueo de la cafeína sobre los receptores A₁, como ya se ha comentado previamente. Aun así, un consumo habitual de café, acabaría favoreciendo la sensibilidad a la insulina, y aunque los mecanismos no estén nada claros, parece ser que la adaptación e implicación de la microbiota intestinal sería un punto a tener en cuenta [261], favoreciendo la liberación de ciertas hormonas, como las incretinas, implicadas en la reducción del estrés oxidativo y de la inflamación crónica de bajo nivel. De forma general, el consumo regular de café provoca un aumento de marcadores como IL-4, IL-10 y adiponectina mientras que reduce los componentes proinflamatorios IL-1 β ,

IL-6, TNF α , PCR, MCP-1, péptidos c e IL-18, tal y como describe Akash et al. en la tabla 3 [16].

Tabla 3. Efectos generales del consumo prolongado de café sobre marcadores inflamatorios

Biomarcador	Efecto del consumo de café	Biomarcador	Efecto del consumo de café
IL-1 β	Disminución	Péptidos c	Disminución
IL-6	Disminución	IL-18	Disminución
TNF α	Disminución	IL-4	Aumento
PCR	Disminución	IL-10	Aumento
MCP-1	Disminución	Adiponectina	Aumento

Adaptado de Akash, M.S. et al. [16].

La reducción en las concentraciones de estos componentes proinflamatorios parece ser debida, como se ha comentado en el apartado dedicado a los ACG, al efecto inhibitorio de estos compuestos sobre el NF- κ β [16, 251].

El hecho de esta dualidad entre sensibilidad y resistencia a la insulina por efecto de la toma de café implica que una gran parte de los estudios que han intentado relacionar café y salud se hayan desarrollado en personas diabéticas. La causa de enfermedad es una disfunción de las células β -pancreáticas, las cuales no pueden ejercer su función correctamente debido al estrés oxidativo que sufren. Este estrés puede ser reducido gracias al consumo regular de café, capaz de antagonizar los efectos adversos del estrés oxidativo en personas diabéticas [16].

Otro efecto de los ACGs es sobre la glucosa-6-fosfatasa, regulador de la glucemia por la hidrólisis de glucosa 6-fosfato a glucosa y fosfato, y cuya expresión es mayor a la habitual en el caso de la DM2, provocando un aumento de la glucemia en personas enfermas con esta patología [16]. El consumo de café, debido al efecto de los ACG, provoca, una inhibición de la glucosa-6-fosfatasa, permitiendo una menor producción de glucosa hepática y de glucemia.

La salida de glucosa de los tejidos periféricos mediada por el transportador GLUT-4 parece que depende del consumo de café, y de sus compuestos fenólicos. A diferencia de la cafeína, la cual es capaz de favorecer la liberación de glucosa a través de la vía de la adenosina 5'-monofosfato, el café puede favorecer la liberación de glucosa mediada por insulina a través de GLUT-4 [16]. Además, la absorción intestinal

también se ve modificada debido a la modulación de GIP y GLP-1, hormonas secretadas en respuesta a la absorción de glucosa [16].

La revisión realizada por Turnbull, D. et al. [10] estudia, en uno de sus apartados, los efectos de la toma de café en una cohorte durante un largo periodo de tiempo (6-28 años, dependiendo del artículo en cuestión). Pese a que la mayoría de los estudios incluidos en esta revisión no obtienen resultados convincentes sobre si la toma de cafeína tiene algún efecto sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, algunos de ellos sí observan que tomar 400 mg de cafeína al día tiene un mayor efecto cardioprotector que tomar más de 400 mg. En cambio, otros resultados de estudios que componen dicha revisión concluyeron que la toma de 7 o más cafés (o té verde) al día reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares cuando es comparado con individuos cuya ingesta es escasa o nula.

Por lo que respecta a las enfermedades coronarias, infarto agudo de miocardio, derrame cerebral o arritmias, la mayoría de estudios observados concluyen que no hay relación entre el aumento de riesgo de padecer estas enfermedades y un consumo elevado de cafeína [10].

En cuanto a la presión arterial, son muchos los estudios que han analizado qué efecto tiene la cafeína sobre este parámetro. La mayoría de estudios experimentales concluyen que existe un aumento de la presión arterial después de la toma de cafeína en personas normotensas [10]. En personas hipertensas, la tendencia es la misma, aunque a menudo el aumento de los niveles de tensión arterial es mayor y dura más tiempo que en personas normotensas. Respecto al ritmo cardíaco, los resultados son ambiguos y no concluyentes, ya que, aunque la mayoría de los estudios observan que no hay variaciones en este parámetro, existen bastantes estudios que observan aumento o descenso del ritmo cardíaco después de la toma de cafeína.

No se ha establecido una asociación directa entre el consumo de cafeína y el riesgo de padecer cáncer de estómago, colorrectal, de colon, rectal, de ovarios, tiroides, mama, páncreas, laringe, linfoma o glioma. Aunque estadísticamente sí que se reduce el riesgo de padecer otros tipos de cáncer, como: próstata, endometrio, melanoma, cáncer de piel no asociado a melanoma y de hígado [274].

Uno de los problemas a veces asociados a la toma de este tipo de sustancias es la tolerancia que provocan, entendiéndolo como tolerancia a la necesidad de tomar una mayor cantidad de producto para obtener los mismos efectos que se obtenían con dosis inferiores. En este sentido, el estudio realizado por Lovallo et al. [275] demostró

como después de un período de 5 días de toma de cafeína existía tolerancia cuando la dosis era de 600 mg, mientras que no se encontraban diferencias con dosis de 300 mg.

Capítulo 2: OBJETIVOS

Diferentes estudios, desarrollados mayoritariamente in vitro, han demostrado que la cafeína podría ejercer un efecto antiinflamatorio, incrementando los niveles de mediadores antiinflamatorios, como la IL-10, y disminuyendo los niveles de potentes productos proinflamatorios, como el TNF α . Adicionalmente, se ha visto que sustancias como los ACGs, que se encuentran de forma especial en el café, también podrían tener un efecto antiinflamatorio. Por otra parte, se ha demostrado que la actividad física moderada, desarrollada de forma habitual, provoca una disminución del estado inflamatorio del organismo, observándose el efecto contrario, y de forma independiente, por parte del comportamiento sedentario.

En relación con la actividad física puntual, se ha descrito que una sesión de actividad física genera una respuesta inflamatoria con unas características predominantemente antiinflamatorias. Se ha indicado que esta característica se debería mayoritariamente a la acción de la IL-6, que sería la primera citocina que aparece en la circulación durante el ejercicio y a la que, en esta situación, se han atribuido propiedades antiinflamatorias. Algunos de los mecanismos de actuación de la cafeína en el organismo podrían provocar concentraciones superiores de citocinas como la IL-6 y la IL-10, induciendo un carácter más antiinflamatorio a esta respuesta.

Considerando estas ideas generales, así como todo lo expuesto previamente se establece el objetivo general y los objetivos específicos de la presente tesis.

Objetivo general

Determinar el efecto de la actividad física en combinación con la ingesta de cafeína sobre el estado inflamatorio del organismo.

Objetivos específicos

1. Analizar, en población sana, si existe asociación entre la concentración de marcadores de inflamación y los niveles de actividad física, sedentarismo o la ingesta habitual de cafeína.

2. Determinar, en una población de deportistas recreacionales bien entrenados, el efecto de una sesión de actividad física en combinación con un suplemento de cafeína en la:
 - Concentración en plasma de marcadores de inflamación.
 - Concentración en plasma de AMPc, adrenalina y cortisol.
 - Producción estimulada in vitro de citocinas por parte de leucocitos.

Capítulo 3: HIPÓTESIS

La hipótesis de trabajo era que la actividad física, en combinación con la ingesta de cafeína provoca una respuesta antiinflamatoria superior a la que podría observarse al considerar solo la actividad física.

Esta hipótesis se aplicaba tanto a una sesión puntual de ejercicio no extenuante combinada con una dosis de cafeína como a la práctica continua de actividad física moderada en combinación con la ingesta habitual de productos que contengan cafeína.

Capítulo 4: RESULTADOS

Artículo I

Effects of Habitual Caffeine Intake, Physical Activity Levels, and Sedentary Behavior on the Inflammatory Status in a Healthy Population

Rodas, Ll., Riera-Sampol, A., Aguiló, A., Martínez, S., Tauler, P. (2020).
Nutrients, 12 (8): 2325. Doi: 10.3390/nu12082325.

Effects of habitual caffeine intake, physical activity levels and sedentary behavior on the inflammatory status in a healthy population

Lluís Rodas ¹, Aina Riera-Sampol ², Antoni Aguiló ³, Sonia Martínez ^{3,*} and Pedro Tauler ^{4,*}

¹ Research Group on Evidence, Lifestyles & Health, University of the Balearic Islands, Palma, Spain; lluisrodas@hotmail.com

² Research Group on Evidence, Lifestyles & Health, Department of Nursing and Physiotherapy. University of the Balearic Islands, Palma, Spain; ana.riera@uib.es

³ Research Group on Evidence, Lifestyles & Health, Department of Nursing and Physiotherapy, University of the Balearic Islands. Health Research Institute of the Balearic Islands (IdISBa), Palma, Spain; aaguilo@uib.es (A.A.); sonia.martinez@uib.es (S.M.)

⁴ Research Group on Evidence, Lifestyles & Health. Department of Fundamental Biology and Health Sciences, University of the Balearic Islands; Health Research Institute of the Balearic Islands (IdISBa). Palma, Spain; pedro.tauler@uib.es

* Correspondence: sonia.martinez@uib.es (S.M.) and pedro.tauler@uib.es (P.T.)

Abstract: Low-grade chronic inflammation is associated with many chronic diseases and pathological conditions. The aim of the present study was to determine the effect of regular caffeine intake, physical activity levels and sedentary behavior on the inflammatory status in healthy participants. 112 men and 132 women aged 18 to 55 years and belonging to the staff and student population of the University of the Balearic Islands volunteered to participate in this descriptive cross-sectional study. Plasma concentrations of pro-inflammatory and anti-inflammatory markers were measured. Weight, height, and body composition (bioelectrical impedance) were determined. Caffeine intake, physical activity levels and sitting time, and diet quality were determined using questionnaires. Statistical regression analysis showed that caffeine intake was a negative predictor of C-reactive protein (CRP) ($p=0.001$). Body fat percentage was positively associated with CRP ($p<0.001$) and inversely associated with adiponectin ($p=0.032$) and interleukin (IL)-10 levels ($p=0.001$). Visceral fat was the main predictor for IL-6 ($p<0.001$) and tumor necrosis factor (TNF)- α ($p<0.001$). Sitting time was found to be the main, inverse, predictor for IL-10 ($p<0.001$), and a positive predictor for TNF- α ($p<0.001$). In conclusion, regular caffeine consumption induced very limited anti-

inflammatory effects. Sedentary behavior and body fat accumulation induced significant pro-inflammatory effects.

Keywords: caffeine; coffee; physical activity; sitting time; inflammation; body fat

1. Introduction

Low-grade chronic inflammation is characterized by chronically (two to three-fold) increased concentrations, of several cytokines such as interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α , as well as other pro-inflammatory substances such as C-reactive protein (CRP) [1]. Fat accumulation has been suggested to be the main reason for increased levels of these pro-inflammatory markers [2,3]. Many chronic diseases such as arthritis, type-2 diabetes or cancer, and pathological conditions such as insulin resistance or atherosclerosis have been found to be associated with low-grade systemic inflammation [2–4].

Physical inactivity has also been linked to low-grade systemic inflammation and subsequent increased risk for the development of chronic diseases [5]. On the other hand, regular exercise has been associated with an anti-inflammatory status, characterized by higher levels of anti-inflammatory markers such as IL-10 and adiponectin, and lower levels of pro-inflammatory cytokines, including IL-6, TNF- α and IL-1 β [2,4]. It has been pointed out that exercise-induced anti-inflammatory effects could be produced by reduced fat accumulation [2]. Interestingly, sedentary behavior, commonly defined as any sitting activity with a low energy expenditure, has been also linked to low-grade inflammation, independently of physical activity levels or adiposity [6–9].

Caffeine, due to its widespread presence in foods such as coffee, tea and chocolate, and its stimulant effects, is highly consumed around the world. In vitro studies have suggested an anti-inflammatory role for caffeine, mainly inhibiting TNF- α production [10]. Regarding in vivo studies, only a few have addressed the effects of caffeine supplementation on blood inflammatory markers in humans [11]. These studies used a single dose of caffeine, or used coffee as supplement when longer interventions were tested, reporting slight anti-inflammatory effects from the supplementation [12,13]. However, when coffee is used, many more components than caffeine alone are included in the supplement, as coffee is rich in bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties, mainly chlorogenic acids [14,15]. In a similar way, when effects of habitual caffeine intake are analyzed it is impossible not to consider coffee

consumption and the contribution of other coffee components, because in most countries, including Spain, coffee has been reported to be the main dietary source of caffeine [16]. In this regard, it has been shown that regular coffee intake is associated with reduced risk of type 2 diabetes [17,18] and metabolic syndrome [19] among other clinical conditions where low-grade inflammation and oxidative stress is involved in their development [11]. Furthermore, studies have shown anti-inflammatory effects of regular coffee consumption [20–23].

To our knowledge the effect of habitual caffeine intake on the inflammatory status of people performing different levels of physical activity, while taking into consideration the amount of sitting time, in a healthy young population has not yet been determined. Therefore, the aim of the present study was to determine the effect of regular caffeine intake, physical activity levels and sedentary behavior on the inflammatory status in healthy participants. Because physical activity and also caffeine, or coffee, have been suggested to induce anti-inflammatory effects, it could be expected that physically active participants consuming caffeine could present a more anti-inflammatory profile.

2. Materials and Methods

2.1. Study design and participants

Two hundred and forty-four participants (112 men and 132 women) volunteered to participate in this descriptive cross-sectional study. Participants were recruited among healthy students, workers, researchers and lecturers from the University of the Balearic Islands. All the participants were informed of the purpose and demands of the study before giving their written consent to participate. The protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki for research of human participants and was approved by the Balearic Islands Clinical Investigation Ethics Committee (IB 2399/14 PI).

Participants were enrolled after fulfilling all inclusion criteria and presenting none of the exclusion criteria. Participants could be included if they were currently healthy, aged between 18-55 years and to have maintained constant physical activity levels (regardless of how high or low the level of activity) and sedentary behavior within the previous two months. Exclusion criteria were: smokers, professional, elite and those athletes with a habitual participation in endurance and ultra-endurance events, significant body weight fluctuations within the previous two months (± 2 kg), regular alcohol or drugs consumption, and habitual consumption, or consumption within the 2 weeks preceding the study, of anti-inflammatory medication. Two hundred and forty-

eight participants were recruited, but blood samples could not be obtained from four, leading to the final number of participants indicated above.

2.2. Laboratory visit

Participants arrived at the laboratory between 08:00 and 10:00 hours following an overnight fast of approximately 12 h. They had been previously informed about the study demands and about the inclusion and exclusion criteria. They had also been instructed to abstain from any moderate-vigorous intensity exercise during the 24 h before coming to the laboratory. Information about the study was given again to the participants, they completed an inclusion/exclusion criteria questionnaire and they then signed an informed consent form. Each participant was asked to empty their bladder before body mass, height and body composition were recorded. Participants then sat quietly for 10 min and completed questionnaires to determine physical activity levels, caffeine intake and adherence to the Mediterranean diet, before a blood sample was taken. The women were also asked about the date of their last menstruation. Seated venous blood samples were collected in suitable vacutainers with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Plasma was obtained from the blood samples within 30 min after blood collection by centrifugation (15 min, 1000×g, 4°C). Plasma aliquots were stored at -70°C until measurements were performed.

2.3. Anthropometrical measurements

Height was measured to the nearest 0.5 cm using a stadiometer (Seca 220 (CM) Telescopic Height Rod for Column Scales, Seca gmbh, Hamburg). Body weight, percentage of body fat mass and rating of visceral fat were measured using a Body Composition Analyzer (Bioelectrical Impedance Analysis, TANITA MC-780MA, TANITA Europe BV, Amsterdam, The Netherlands). Body weight was measured to the nearest 0.1 kg. The visceral fat measurement using this methodology provides a rating from 1 to 59, with values from 1 to 12 considered healthy (arbitrary units and information provided by the manufacturer, <https://tanita.eu/help-guides/products-manuals/>). Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$).

2.4. Questionnaires

Physical activity levels were determined using the standard short form of the validated International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), thus providing quantitative information on physical activity levels in metabolic equivalents (MET)-h-week⁻¹. Total weekly physical activity time and daily sitting time were also determined.

Diet quality was measured as the Adherence to the Mediterranean diet using a simplified assessment of adherence to the Mediterranean Diet (14-item questionnaire),

previously developed and validated for the Spanish population [24]. Each item was scored as 0 or 1. A global score of 9 or higher indicates a good adherence to the Mediterranean Diet.

Habitual caffeine intake was measured using a self-reported questionnaire previously developed and used by our group [25,26]. The frequency intake of common products containing caffeine was ascertained, and caffeine daily consumption determined by using the caffeine content of each product [16]. Products included in the questionnaire were coffee preparations, including decaffeinated coffee, instant coffee (as cups or spoons), tea, chocolate, cola drinks, energy or stimulant beverages, and pharmaceutical caffeine supplements. Coffee intake was estimated from the intake of each coffee preparation contained in the questionnaire. The most common preparations in Spain were considered: espresso, “cortado” (espresso coffee, one serving, with a shot of milk) and “café con leche” (white coffee, or espresso coffee, one serving, with the remaining half of a cup filled with milk or steamed milk). Because a dose-response plasma appearance of the chlorogenic and phenolic acids contained in coffee has been shown after instant coffee ingestion [27], and because of its caffeine content, instant coffee was also considered as a coffee preparation. When applicable, the number of instant coffee servings was determined considering the number of spoons indicated by participants and that each serving contained 3.4 g of instant coffee [27]. Therefore, the total coffee intake, in number of servings, was determined considering all preparations indicated above.

2.5. Measurement of inflammatory markers

Plasma IL-10, IL-6, IL-1 β , TNF- α , adiponectin and CRP concentrations were determined to describe the inflammatory status of participants. These inflammatory markers were measured using commercially available solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assays and performed according to the manufacturers' instructions. Concentrations of IL-10, IL-6 and TNF- α were measured using Invitrogen high sensitivity kits (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA). IL-10 was measured using the “IL-10 Human ELISA Kit, High Sensitivity” (BMS215HS); IL-6 was measured using the “IL-6 Human ELISA Kit, High Sensitivity” (BMS213HS); and TNF- α was measured using the “TNF alpha Human ELISA Kit, High Sensitivity” (BMS223HS). IL-1 β , adiponectin and CRP were measured using RayBio® kits (RayBiotech, Norcross, GA, USA). IL-1 β was measured using the “Human IL-1 beta ELISA” (ELH-IL1b); Adiponectin was measured using the “Human Adiponectin (Acrp30) ELISA” (ELH-Adiponectin); and CRP was measured using the “Human CRP ELISA” (ELH-CRP). All

kits were exclusive for human samples (plasma, serum and culture supernatants), and micro-plates were supplied with wells pre-coated with the specific antibody. For all assays, the absorbance was measured spectrophotometrically on a microplate reader (PowerWavei; BioTek, Winooski, VT), and the concentration of each cytokine was calculated by comparison with a calculation curve established in the same measurement.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using IBM SPSS Statistics 22.0 software (SPSS/IBM, Chicago, IL, USA). All the data were tested for their normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test). The results are expressed as means and standard deviations (SD), or median and interquartile ranges as specified. Percentages were also used when required. Student's t-test for unpaired data or the Mann-Whitney U test were used to evaluate differences between sexes. Kruskal-Wallis one-way ANOVA was used to determine the effect of the menstrual cycle on cytokine, adiponectin and CRP concentrations in women. Because no effect of menstrual cycle was observed (results not shown), this variable was not included in the following main analysis. The existence of significant bivariate correlations between the main variables was ascertained by determining Pearson correlation coefficients. These correlations were determined for the whole sample and for male and female participants separately. Multiple linear regression analysis, using the stepwise procedure, was applied to determine the relation between each dependent variable (logarithmic transformed IL-10, IL-6, IL-1 β , TNF- α , adiponectin and CRP concentrations) and independent and control variables. Habitual caffeine intake, IPAQ score and sitting time were included in the analysis as independent variables. Sex, body fat percentage, visceral fat rating and diet quality, measured as the Adherence to the Mediterranean diet, were included in the analysis as control variables. Kruskal-Wallis one-way ANOVA was used to analyze IL-10 and TNF- α values depending on sitting time categorized in tertiles. A post-hoc power analysis calculation was performed (G*Power 3.1.9.4. Universität Kiel, Germany) for the regression analysis (n=244, eight predictors, $\alpha=0.05$). The power statistical calculation reported values higher than 90% for all significant regression reported. Statistical significance was accepted at $p<0.05$.

3. Results

3.1. General characteristics of participants in the study

Table 1 shows the general characteristics of participants in the study stratified per sex. The study population was, on average, young, with a BMI value within the normal

weight range, a Mediterranean diet score slightly under the threshold for a good adherence, and with a higher number of women. Regarding anthropometrical characteristics, 20.5% of participants were overweight (BMI between 25 and 30 kg·m⁻²), and 3.7% were obese (BMI higher than 30 kg·m⁻²). On the other hand, 2.2% of participants showed an unhealthy visceral fat rating. Regarding caffeine intake, 4.9% of participants did not take caffeine, and 17% of participants took more than 400 mg per day (which is considered the higher-end value for a throughout the day, not in a single dose, safe consumption in healthy people [16]). Regarding coffee intake, 22.1% of participants reported no coffee intake, and 7% of participants reported an intake greater than 3 servings. Men reported non-significantly higher physical activity levels, both when expressed in METs and in hours. No significant differences between sexes were observed in the sitting time.

Table 1. General characteristics of participants in the study.

	All (n=244)	Men (n=112)	Women (n=132)	p value
Age (years)	32.1 ± 10.8	33.4 ± 10.8	31.1 ± 10.8	0.098
Weight (kg)	66.9 ± 13.3	76.3 ± 11.4	58.9 ± 8.7	<0.001*
Height (cm)	170.0 ± 9.0	177.0 ± 6.5	164.0 ± 6.0	<0.001*
BMI (kg·m ⁻²)	23.0 ± 3.4	24.3 ± 3.3	22.0 ± 3.2	<0.001*
Fat mass (%)	23.3 ± 7.9	18.3 ± 6.3	27.6 ± 6.5	<0.001*
Visceral fat rating	4.01 ± 3.30	5.66 ± 3.68	2.63 ± 2.12	<0.001*
Mediterranean diet score	8.18 ± 1.91	8.22 ± 1.93	8.15 ± 1.91	0.771
Caffeine intake (mg·day ⁻¹)	164.3 ± 143.4	174.7 ± 152.4	155.5 ± 135.3	0.298
Caffeine intake (mg·kg body weight ⁻¹ ·day ⁻¹)	2.48 ± 2.18	2.33 ± 2.18	2.60 ± 2.18	0.346
Coffee intake (servings·day ⁻¹)	1.32 ± 1.35	1.41 ± 1.47	1.24 ± 1.25	0.311
Physical activity levels (METs·hour·week ⁻¹)	43.8 ± 36.1	48.7 ± 33.7	39.7 ± 37.5	0.054
Physical activity (hours·week ⁻¹)	9.18 ± 8.50	9.90 ± 7.36	8.57 ± 9.35	0.224
Sitting time (hours·day ⁻¹)	6.96 ± 2.77	7.20 ± 3.09	6.77 ± 2.46	0.235

Values are expressed as means ± standard deviations. * indicates significant differences between sexes (with p significant values also in bold) (p<0.05), Student's t-test for unpaired data. BMI: body mass index.

3.2. Sources of caffeine consumption

Among caffeine consumers, coffee was the main caffeine source for participants in the study (Table 2). No significant differences were found between male and female participants.

Table 2. Sources of caffeine intake among those participants consuming caffeine.

Source	All (n=228)	Men (n=105)	Women (n=123)	p value
Coffee (%)	67.5 ± 37.1	69.6 ± 37.4	66.0 ± 36.9	0.538
Tea (%)	10.1 ± 19.8	8.9 ± 19.4	11.0 ± 20.1	0.425
Cola drinks (%)	12.8 ± 24.7	14.0 ± 26.8	11.8 ± 22.9	0.506
Chocolate (%)	7.9 ± 20.4	5.2 ± 14.1	10.2 ± 24.2	0.054
Energetic drinks (%)	1.6 ± 7.6	2.2 ± 9.0	1.0 ± 6.1	0.241
Sport products (%)	0.1 ± 0.7	0.1 ± 1.0	n.d.	0.175

Values are expressed as means ± standard deviations and represent the caffeine contribution in percentage of each source with respect to total caffeine intake. No differences between men and women were found, Student's t-test for unpaired data. n.d.: non detected (no consumption reported)

3.3. Concentration of inflammatory markers

Table 3 shows cytokine concentrations of all participants and categorized by sex. Significant differences were observed for IL-6, TNF- α , CRP and adiponectin, with higher values in men for IL-6 ($p=0.003$) and TNF- α ($p=0.005$), and higher values in women for CRP ($p<0.001$) and adiponectin ($p<0.001$).

Table 3. Cytokine concentrations of participants in the study.

Inflammatory marker	All (n=244)	Men (n=112)	Women (n=132)	p value
IL-10 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.65 (0.54, 0.77)	0.65 (0.55, 0.83)	0.66 (0.54, 0.74)	0.333
IL-6 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.17 (1.44, 3.04)	2.38 (1.84, 3.12)	1.89 (1.14, 2.99)	0.003*
IL-1 β ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	3.84 (2.66, 6.29)	4.02 (2.88, 6.40)	3.58 (2.43, 6.00)	0.205
TNF- α ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.98 (1.52, 2.68)	2.11 (1.64, 3.04)	1.76 (1.49, 2.51)	0.005*

CRP ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	3.50 (1.81, 5.67)	2.46 (1.58, 4.28)	4.26 (2.42, 6.34)	<0.001*
Adiponectin ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	5.78 (3.62, 7.96)	4.59 (3.12, 6.22)	6.72 (4.77, 8,78)	<0.001*

Values are expressed as median (25th, 75th percentile). * indicates significant differences between men and women (with p values in bold) ($p < 0.05$), Mann Whitney U test. IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor; CRP: C-reactive protein.

3.4. Bivariate correlations between dependent and independent variables

Table 4 shows bivariate correlations between all dependent and independent (continuous) variables. Positive correlations were found for IL-6 ($p=0.001$) and TNF- α ($p=0.014$) with age. However, IL-10 was inversely correlated with age ($p=0.032$). Caffeine intake was inversely correlated with CRP levels ($p=0.044$). Physical activity levels were correlated with IL-10 ($p=0.002$). Sitting time showed a positive correlation with TNF- α ($p < 0.001$) and an inverse correlation with IL-10 levels ($p < 0.001$). Percentage of body fat was correlated with CRP ($p < 0.001$), while it was inversely correlated with IL-10 ($p=0.001$) and adiponectin ($p < 0.001$). An inverse correlation was found between visceral fat rating and IL-10 ($p=0.013$). However, visceral fat showed positive correlations with IL-6 ($p < 0.001$) and TNF- α ($p < 0.001$). IL-1 β levels were correlated with the adherence to the Mediterranean diet ($p=0.039$).

Table 4. Bivariate correlations between dependent and independent variables (all participants).

	Age	%Fat	Vis Fat	MD	Caffeine	PA	Sit
IL-10	-0.138 (0.032*)	-0.219 (0.001*)	-0.159 (0.013*)	-0.083 (0.197)	-0.094 (0.142)	0.195 (0.002*)	-0.325 (<0.001*)
IL-6	0.205 (0.001*)	0.063 (0.329)	0.290 (<0.001*)	-0.032 (0.615)	0.089 (0.164)	-0.037 (0.561)	0.003 (0.957)
IL-1β	0.006 (0.932)	0.071 (0.267)	0.052 (0.417)	0.132 (0.039*)	-0.006 (0.930)	-0.009 (0.889)	-0.030 (0.639)
TNF-α	0.157 (0.014*)	0.086 (0.180)	0.335 (<0.001*)	-0.023 (0.717)	0.067 (0.299)	-0.081 (0.208)	0.249 (<0.001*)
CRP	0.009 (0.889)	0.427 (<0.001*)	0.115 (0.074)	-0.109 (0.088)	-0.129 (0.044*)	-0.037 (0.563)	-0.039 (0.549)

Adiponectin	-0.107	-0.222	-0.117	-0.012	-0.087	-0.041	-0.003
	(0.095)	(<0.001*)	(0.072)	(0.429)	(0.182)	(0.520)	(0.963)

Pearson correlation coefficient and (p value) is shown (n=244). * indicates significant correlations (with p values in bold) ($p < 0.05$). % Fat: percentage of total body fat; Vis fat: visceral fat rating; MD: adherence to the Mediterranean diet; Caffeine: caffeine intake; PA: physical activity levels. Sit: sitting daily time. Logarithmic transformations of dependent variables were used. IL: interleukin; CRP: C-reactive protein; TNF: tumor necrosis factor.

Table 5 shows bivariate correlations between all dependent and independent variables in female participants. An inverse correlation was found between IL-10 and age ($p = 0.020$). However, a positive correlation was found for IL-6 with age ($p = 0.023$). Physical activity levels were correlated with IL-10 ($p = 0.033$). Sitting time showed a positive correlation with TNF- α ($p = 0.001$) and an inverse correlation with IL-10 levels ($p = 0.001$). Percentage of body fat showed a positive correlation with CRP ($p < 0.001$). Positive correlations were found for IL-6 ($p = 0.037$) and TNF- α ($p = 0.049$) with visceral fat. No correlation was found for adherence to the Mediterranean diet or caffeine intake with any of the dependent variables.

Table 5. Bivariate correlations between dependent and independent variables in females.

	Age	%Fat	Vis Fat	MD	Caffeine	PA	Sit
IL-10	-0.203	-0.133	-0.170	-0.045	-0.098	0.185	-0.281
	(0.020*)	(0.128)	(0.052)	(0.605)	(0.265)	(0.033*)	(0.001*)
IL-6	0.198	0.162	0.182	-0.046	0.054	-0.100	0.017
	(0.023*)	(0.064)	(0.037*)	(0.597)	(0.539)	(0.254)	(0.844)
IL-1β	-0.005	-0.011	0.048	0.157	-0.016	-0.028	-0.091
	(0.959)	(0.902)	(0.588)	(0.072)	(0.854)	(0.754)	(0.300)
TNF-α	0.096	0.164	0.172	-0.062	-0.034	-0.016	0.297
	(0.274)	(0.060)	(0.049*)	(0.479)	(0.699)	(0.856)	(0.001*)
CRP	-0.066	0.330	0.158	-0.097	-0.155	0.030	0.048
	(0.455)	(<0.001*)	(0.070)	(0.267)	(0.077)	(0.729)	(0.582)

Adiponectin	-0.111	0.063	-0.053	0.152	-0.027	-0.106	-0.062
	(0.243)	(0.510)	(0.579)	(0.109)	(0.773)	(0.268)	(0.513)

Pearson correlation coefficient and (p value) is shown (n=132). * indicates significant correlations (with p values in bold) ($p < 0.05$). % Fat: percentage of total body fat; Vis fat: visceral fat rating; MD: adherence to the Mediterranean diet; Caffeine: caffeine intake; PA: physical activity levels. Sit: sitting daily time. Logarithmic transformations of dependent variables were used. IL: interleukin; CRP: C-reactive protein; TNF: tumor necrosis factor.

Table 6 shows bivariate correlation between all dependent and independent variables in male participants. A positive correlation was found between TNF- α and age ($p=0.042$). Physical activity levels were positively correlated with IL-10 ($p=0.010$) and inversely correlated with TNF- α ($p=0.005$). Sitting time showed a positive correlation with TNF- α ($p=0.047$) and an inverse correlation with IL-10 levels ($p < 0.001$). Percentage of body fat was correlated with IL-6 ($p=0.001$), TNF- α ($p < 0.001$) and CRP ($p < 0.001$), while it was inversely correlated with adiponectin ($p < 0.001$) and IL-10 ($p=0.002$). Visceral fat was correlated with IL-6 ($p=0.002$), TNF- α ($p < 0.001$) and CRP ($p < 0.001$), and it was inversely correlated with IL-10 ($p=0.008$). No correlation was found for adherence to the Mediterranean diet or caffeine intake with any of the dependent variables.

Table 6. Bivariate correlations between dependent and independent variables in males.

	Age	%Fat	Vis Fat	MD	Caffeine	PA	Sit
IL-10	-0.100	-0.295	-0.249	-0.120	-0.102	0.242	-0.369
	(0.296)	(0.002*)	(0.008*)	(0.207)	(0.286)	(0.010*)	(<0.001*)
IL-6	0.180	0.300	0.293	-0.024	0.130	-0.023	-0.042
	(0.058)	(0.001*)	(0.002*)	(0.803)	(0.164)	(0.806)	(0.662)
IL-1β	-0.002	-0.054	-0.011	0.094	-0.006	0.004	0.026
	(0.980)	(0.577)	(0.913)	(0.323)	(0.953)	(0.953)	(0.784)
TNF-α	0.193	0.353	0.378	0.115	0.148	-0.262	0.188
	(0.042*)	(<0.001*)	(<0.001*)	(0.226)	(0.118)	(0.005*)	(0.047*)
CRP	0.166	0.366	0.381	-0.122	-0.074	-0.051	0.076
	(0.079)	(<0.001*)	(<0.001*)	(0.200)	(0.440)	(0.594)	(0.424)

Adiponectin	-0.107	-0.222	-0.117	-0.012	-0.087	-0.041	-0.003
	(0.095)	<0.001*	(0.072)	(0.429)	(0.182)	(0.520)	(0.963)

Pearson correlation coefficient and (p value) is shown (n=112). * indicates significant correlations (with p values in bold) ($p < 0.05$). % Fat: percentage of total body fat; Vis fat: visceral fat rating; MD: adherence to the Mediterranean diet; Caffeine: caffeine intake; PA: physical activity levels. Sit: sitting daily time. Logarithmic transformations of dependent variables were used. IL: interleukin; CRP: C-reactive protein; TNF: tumor necrosis factor.

3.5. Multivariable linear regression analysis

Table 7 shows the results of the regression analysis for IL-10. Regression analysis revealed that sitting time ($p < 0.001$) and the percentage of fat ($p = 0.001$) were negative predictors for IL-10 levels, while physical activity was a positive predictor ($p = 0.028$). Sitting time was found to be the main predictor (change in R^2 0.106 vs. 0.040 for fat mass and 0.017 for physical activity).

Table 7. Multiple linear regression for IL-10

Variable	B	95% CI	β	t	p value
Age	-0.002	(-0.006, 0.002)	-0.104	-1.706	0.089
Sex	0.010	(-0.060, 0.080)	0.042	0.568	0.570
Fat mass	-0.003	(-0.005, -0.001)	-0.189	-3.171	0.002*
Visceral fat rating	-0.002	(-0.014, 0.010)	-0.066	-1.346	0.180
Adherence to MD	-0.005	(-0.013, 0.003)	-0.078	-1.324	0.187
Caffeine intake	0.000	(-0.001, 0.000)	-0.080	-1.336	0.183
Physical activity	0.000	(0.000, 0.001)	0.136	2.218	0.028*
Sitting time	-0.012	(-0.017, -0.007)	-0.281	-4.607	<0.001*

Model: R: 0.405; R^2 0.164; Adjusted R^2 0.153; $p < 0.001$; * indicates significant predictors (with p values in bold) ($p < 0.05$). IL: interleukin; MD: Mediterranean diet; CI: confidence intervals.

Table 8 shows the regression analysis results for adiponectin. Sex was revealed as the main predictor for adiponectin (change in R^2 0.097, $p < 0.001$), with higher values

for females, as has been indicated above. Percentage of fat mass was inversely associated with adiponectin (change in R^2 0.017, $p=0.032$).

Table 8. Multiple linear regression for adiponectin

Variable	B	95% CI	β	t	p value
Age	0.000	(-0.004, 0.004)	-0.019	-0.285	0.776
Sex	0.194	(0.124-0.265)	0.407	5.426	<0.001*
Fat mass	-0.005	(-0.009, -0.001)	-0.162	-2.156	0.032*
Visceral fat rating	0.004	(-0.004-0.012)	0.050	0.443	0.658
Adherence to MD	0.008	(-0.006, 0.022)	0.065	1.075	0.283
Caffeine intake	0.000	(-0.001, 0.000)	-0.068	-1.092	0.276
Physical activity	0.000	(-0.001, 0.000)	-0.012	0.010	0.846
Sitting time	0.003	(-0.007, 0.013)	0.039	0.637	0.585

Model: R^2 0.115; Adjusted R^2 0.107; $p<0.001$; * indicates significant predictors (with p values in bold) ($p<0.05$). MD: Mediterranean diet; CI: confidence intervals.

Table 9 shows the results of the regression analysis for IL-6. Visceral fat was revealed as the only significant predictor for IL-6 ($p<0.001$), with a positive association.

Table 9. Regression analysis for IL-6

Variable	B	95% CI	β	t	p value
Age	0.001	(-0.003, 0.005)	0.013	0.151	0.880
Sex	-0.035	(-0.075, 0.005)	-0.073	-1.055	0.292
Fat mass	-0.001	(-0.003, 0.001)	-0.028	-0.439	0.661
Visceral fat rating	0.021	(0.012, 0.030)	0.290	4.701	<0.001*
Adherence to MD	-0.005	(-0.017, 0.007)	-0.044	-0.706	0.481
Caffeine intake	0.000	(0.000, 0.001)	0.039	0.579	0.563
Physical activity	-0.001	(-0.002, 0.001)	-0.059	-0.948	0.344
Sitting time	-0.003	(-0.011, 0.005)	-0.033	-0.532	0.595

Model: R^2 0.084; Adjusted R^2 0.080; $p < 0.001$; * indicates significant predictors (with p values in bold) ($p < 0.05$). IL: interleukin; MD: Mediterranean diet; CI: confidence intervals.

Sitting time (change in R^2 0.044, $p < 0.001$,) and visceral fat rating (change in R^2 0.112, $p < 0.001$) were found as positive predictors for TNF- α concentrations, with visceral fat as the main predictor (Table 10).

Table 10. Multiple linear regression for TNF- α

Variable	B	95% CI	β	t	p value
Age	-0.002	(-0.005, 0.001)	-0.108	-1.327	0.186
Sex	-0.014	(-0.128, 0.100)	-0.041	-0.608	0.544
Fat mass	-0.001	(-0.011, 0.010)	-0.023	-0.367	0.714
Visceral fat rating	0.016	(0.010, 0.022)	0.309	5.166	<0.001*
Adherence to MD	0.001	(-0.009, 0.012)	0.007	0.119	0.905
Caffeine intake	0.000	(-0.001, 0.000)	-0.060	-0.936	0.350
Physical activity	0.000	(-0.001, 0.000)	-0.025	-0.984	0.326
Sitting time	0.013	(0.004, 0.019)	0.211	3.538	<0.001*

Model: R^2 0.156; Adjusted R^2 0.149; $p < 0.001$; * indicates significant predictors (with p values in bold) ($p < 0.05$). TNF: tumor necrosis factor; MD: Mediterranean diet; CI: confidence intervals.

Table 11 shows the results of the regression analysis for CRP. Percentage of fat mass was found as the main predictor for CRP (change in R^2 0.182, $p < 0.001$), showing a positive association. Caffeine intake was shown to be a negative predictor for CRP (change in R^2 0.037, $p = 0.001$). The regression analysis did not report any significant predictor for IL-1 β .

Table 11. Multiple linear regression for CRP

Variable	B	95% CI	β	t	p value
Age	-0.002	(-0.010, 0.006)	-0.039	-0.601	0.549
Sex	-0.016	(-0.082, 0.050)	-0.021	-0.288	0.774
Fat mass	0.018	(0.013, 0.022)	0.454	7.885	<0.001*

Visceral fat rating	0.006	(-0.022, 0.034)	0.063	0.980	0.328
Adherence to MD	-0.011	(-0.029, 0.007)	-0.070	-1.219	0.224
Caffeine intake	-0.002	(-0.003, -0.001)	-0.195	-3.379	0.001*
Physical activity	0.000	(-0.004, 0.004)	0.023	0.407	0.684
Sitting time	0.000	(-0.013, 0.013)	0.011	0.187	0.852

Model: R^2 0.219; Adjusted R^2 0.213; $p < 0.001$; * indicates significant predictors (with p values in bold) ($p < 0.05$). CRP: C-reactive protein; MD: Mediterranean diet; CI: confidence intervals.

3.6. Effects of sitting time on IL-10 and TNF- α concentrations

Figure 1 shows values of IL-10 (a) and TNF- α (b) categorized by sitting time tertiles. A significant effect of sitting time was found for both IL-10 ($p = 0.001$) and TNF- α ($p < 0.001$). IL-10 values in the third tertile (longer sitting time, 9 to 15 hours) were significantly lower ($p = 0.001$) than in the first tertile (shortest sitting time, 1 to 5 hours). TNF- α values in the third tertile were significantly higher than in the second tertile ($p = 0.004$) and in the first tertile ($p < 0.001$).

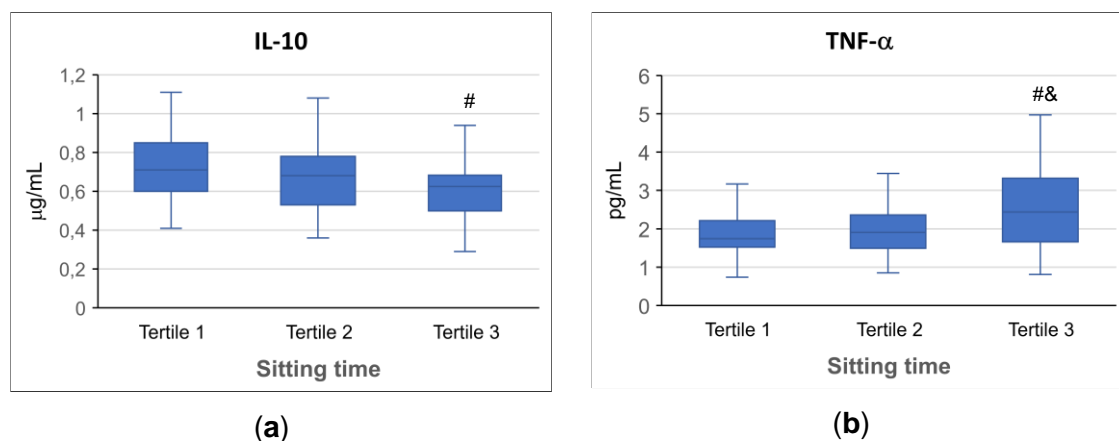


Figure 1. IL-10 (a) and TNF- α (b) plasma concentrations categorized by sitting time tertiles. Median, 25th, 75th percentile, and lowest and highest values are shown for IL-10 and TNF- α values. # indicates significant differences to first tertile. & indicates significant differences to second tertile. IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor.

4. Discussion

The main finding of the present study was that in a healthy population, low caffeine intake could exert a slight anti-inflammatory effect characterized by lower CRP plasma levels. Body fat, both total and visceral, and sedentary behavior have been shown to be important and independent inflammatory predictors, inducing higher levels of pro-inflammatory markers, but also decreased levels of anti-inflammatory markers.

Participants in the study population were, on average, young and with a higher number of women. These characteristics reflect properly the university population, with higher figures for young female students. Caffeine intake observed in the present study was similar to previous studies in Spain, and similar, or slightly lower to the average value, when participants of a similar age from most occidental countries were considered [16,28–30]. Concerning this consumption, coffee remains the main source for caffeine intake, a common finding in most European countries, except for the UK and Ireland [16]. As coffee preparations in Spain are quite different from the ones in other countries, it becomes difficult to compare coffee intake observed in the present study with the habitual intake of other countries. For these reasons, caffeine intake rather than coffee intake, has been used as the main variable for the analysis, and also as an indicator of coffee consumption.

Previous studies, both observational and clinical trials, have reported that coffee intake increases adiponectin levels [13,20]. The mechanism involved seems to be the stimulatory effect of caffeine on the expression of the peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ), which positively elevates the adiponectin concentration [31]. In fact, a previous study reported increased levels of adiponectin after a supplementation with caffeinated coffee but no effect with decaffeinated coffee [13]. However, a higher daily intake of coffee (four cups, or more than 600 mg of caffeine) than that observed in the present study, seems to be required to increase adiponectin levels [20]. Therefore, and as suggested, low amounts of coffee or caffeine consumption may be the reason for not observing a significant effect of caffeine intake on adiponectin [32] but also on IL-10, TNF- α and IL-6 concentrations in the present study. It should also be considered that some studies reporting positive effects of regular coffee consumption on adiponectin levels were performed in overweight participants [13], while in the present study only ~24% of participants were overweight or obese; or in older populations [20]. Therefore, it is possible that the protective effect of coffee was emphasized in such conditions.

The association between CRP, which is considered an appropriate marker for low grade systemic inflammation [33], and coffee intake has been recently reviewed [34].

Despite this review suggesting that on average, coffee consumption is not associated with CRP levels, some studies have reported a protective healthy effect because decreased levels of CRP have been observed in participants ingesting at least a daily cup of coffee [20–23]. Results of the present study are in agreement with this observation as it was observed that caffeine consumption is inversely associated with CRP levels. Therefore, it seems that in contrast with the other inflammatory markers analyzed, low regular coffee intake could be enough to prevent higher CRP levels. It is worth noting however, that decaffeinated coffee seems to also be effective in decreasing CRP levels, therefore other components of coffee rather than caffeine itself, could contribute to this effect [22]. It has been suggested that chlorogenic acid, the main phenolic acid in coffee with antioxidant and anti-inflammatory properties [14], can play an important role in the reduction of inflammatory factors such as CRP [35]. The low, on average, BMI of participants in the present study could have been an important factor that influenced the inverse association between coffee intake and CRP, as all studies reporting the protective anti-inflammatory effect of coffee consumption were performed in populations with low BMIs [20–23]. In fact, it has been suggested that the different BMI of populations considered in previous studies could be a key factor for the inconsistent results found regarding this association [34]. Interestingly, in the present study, and in agreement with previous reports [36,37], a positive association was found between body fat mass and CRP. Therefore, our data indicates that, in the context of an average low BMI, caffeine consumption, probably as a coffee consumption marker, presents an inverse association with CRP, inducing the opposite effect of body fat mass accumulation.

Inverse associations were found between percentage of body fat and anti-inflammatory markers such as adiponectin and IL-10. Adiponectin is an anti-inflammatory adipokine secreted almost exclusively from adipose tissue [38], and low adiponectin levels have been associated with body fat accumulation and obesity, leading to increased risk of inflammation [3]. It is striking that in the present study this potential negative effect was observed in young and healthy participants, with an incidence of obesity as low as 3.7%. In addition, and despite the fact women present a relatively greater percentage body fat, adiponectin levels were found to be higher in women, which is in agreement with previous results, mainly when lean populations have been considered [39].

The anti-inflammatory IL-10 has not been commonly measured when associations between fat mass and inflammation have been investigated. In the present study, and in the same line of results indicated above, IL-10 was inversely associated

with body fat mass. It has been reported that fat accumulation is accompanied by adipose tissue infiltration by pro-inflammatory immune cells (T2), increased release of pro-inflammatory markers such as TNF- α , decreased production of anti-inflammatory markers, such as IL-10, and the development of the low-grade systemic inflammatory state described above [3]. Within this picture, and regarding adipose tissue, visceral fat has been suggested to play an important role [2]. In the present study positive associations were found between visceral fat and TNF- α and also between visceral fat and IL-6. Previous studies, using different approaches to measure visceral fat, have shown similar associations [40–42]. Whether TNF- α and IL-6 levels are more dependent on total body fat or visceral fat remains to be elucidated, because some studies have reported associations with both parameters [37,42,43]. However, taken together, the opposite associations found for IL-10 and, on the other hand, TNF- α and IL-6 with regard to fat content, total or visceral, could reflect the predominant anti-inflammatory production when fat content is low as well as the predominant pro-inflammatory release when fat is accumulated.

In the present study only a small effect of physical activity levels on the IL-10 concentrations were observed. However, more strong associations were found for sedentary time: a positive association with TNF- α and an inverse association with IL-10, which, together, define a pro-inflammatory picture induced by sedentary behavior and independent of physical activity levels. It is possible that the average moderate levels reported could limit the effects of physical activity. However, previous studies showed that sedentary behavior was linked to low-grade inflammation, independently of physical activity levels or adiposity [6–9]. This observation is in agreement with results obtained in the present study and suggests an independent link between sitting time and low-grade inflammation [7]. To our knowledge, the association between sedentary time and IL-10 has not been reported, as previous studies focused on the pro-inflammatory markers. This novel result could indicate that sedentary behavior, independent of fat mass and physical activity, influences levels of both pro-inflammatory and anti-inflammatory compounds.

This study presents some limitations that should be acknowledged. In addition to the limitations due to the observational nature, the current study was limited to cross-sectional data from a single university population. However, the patterns of physical activity and sedentary behavior observed in the present study could be applied to other populations, even outside the university. Both sedentary time and physical activity levels, two of the main variables of the study, were self-reported. However, the IPAQ, which is a widely used and validated questionnaire was utilized to collect these data, as has been

done in previous studies using the same or similar questionnaires [6,9]. Regarding sedentary time, an important limitation was that the number, duration and frequency of sedentary breaks were not recorded. In this regard, it has been reported that these breaks could modify to some extent associations between sedentary time and inflammatory markers [8], at least when sitting time is not too long [7]. Furthermore, methodology used to determine both percentage of fat mass and visceral fat rating has been reported to present some limitations [44]. Finally, despite the statistical power analysis revealed high power for most of the associations found, these associations could be considered weak. However, there is a concordance between most of them, highlighting the pro-inflammatory role of sedentary behavior and fat mass accumulation.

5. Conclusions

The limited effects of caffeine or coffee intake observed in the present study could be explained by relatively low caffeine and coffee intakes. However, this relatively low caffeine or coffee consumption could slightly prevent CRP increases induced by increased fat mass. Sedentary behavior and body fat accumulation, even within the young, healthy and, on average, normal weight participants in the present study induced pro-inflammatory effects. However, only slight effects of physical activity levels were observed. Interestingly, both sedentary behavior and fat accumulation induced lower levels of the essential anti-inflammatory cytokine IL-10. Future studies should be performed to determine coffee intake needed to observe greater health effects and, also, to determine the mechanism linking sedentary behavior to inflammation.

Author Contributions: Conceptualization, P.T. and S.M.; Methodology, P.T., S.M. A.R-S. and L.R.; Formal Analysis, P.T. and A.A.; Investigation, L.R., S.M., A.R-S., A.A. and P.T.; Writing-Original Draft Preparation, L.R.; Writing-Review & Editing, P.T., A.R-S., A.A. and S.M.; Visualization, L.R.; Supervision, P.T. and S.M.; Project Administration, P.T. and S.M.; Funding Acquisition, P.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO), the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the European Regional Development Funds (ERDF), project DEP2013-45966-P (MINECO/AEI/ERDF, EU).

Acknowledgments: The authors would like to thank all the participants in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999, 340, 115–126, doi:10.1056/NEJM199901143400207.
2. Gleeson, M.; Bishop, N.C.; Stensel, D.J.; Lindley, M.R.; Mastana, S.S.; Nimmo, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 2011, 11, 607–615, doi:nri3041 [pii]10.1038/nri3041.
3. Ouchi, N.; Parker, J.L.; Lugus, J.J.; Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 11, 85–97, doi:10.1038/nri2921.
4. Petersen, A.M.W.; Pedersen, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* 2005, 98, 1154–1162, doi:10.1152/jappphysiol.00164.2004.
5. Pedersen, B.K. Health Benefits Related to Chronic Low-Grade Exercise in Patients With Systemic Inflammation. 2007, 1, 289–298, doi:10.1177/1559827607301410.The.
6. Allison, M.A.; Jensky, N.E.; Marshall, S.J.; Bertoni, A.G.; Cushman, M. Sedentary behavior and adiposity-associated inflammation: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am. J. Prev. Med.* 2012, 42, 8–13, doi:10.1016/j.amepre.2011.09.023.
7. Henson, J.; Yates, T.; Edwardson, C.L.; Khunti, K.; Talbot, D.; Gray, L.J.; Leigh, T.M.; Carter, P.; Davies, M.J. Sedentary time and markers of chronic low-grade inflammation in a high risk population. *PLoS One* 2013, 8, 4–9, doi:10.1371/journal.pone.0078350.
8. Healy, G.N.; Matthews, C.E.; Dunstan, D.W.; Winkler, E.A.H.; Owen, N. Sedentary time and cardio-metabolic biomarkers in US adults: NHANES 200306. *Eur. Heart J.* 2011, 32, 590–597, doi:10.1093/eurheartj/ehq451.
9. Yates, T.; Khunti, K.; Wilmot, E.G.; Brady, E.; Webb, D.; Srinivasan, B.; Henson, J.; Talbot, D.; Davies, M.J. Self-reported sitting time and markers of inflammation, insulin resistance, and adiposity. *Am. J. Prev. Med.* 2012, 42, 1–7, doi:10.1016/j.amepre.2011.09.022.
10. Horrigan, L.A.; Kelly, J.P.; Connor, T.J. Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Int Immunopharmacol*

- 2004, 4, 1409–1417, doi:10.1016/j.intimp.2004.06.005S1567-5769(04)00192-4 [pii].
11. Paiva, C.L.R.S.; Beserra, B.T.S.; Reis, C.E.G.; Dorea, J.G.; Da Costa, T.H.M.; Amato, A.A. Consumption of coffee or caffeine and serum concentration of inflammatory markers: A systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019, 59, 652–663, doi:10.1080/10408398.2017.1386159.
 12. Kempf, K.; Herder, C.; Erlund, I.; Kolb, H.; Martin, S.; Carstensen, M.; Koenig, W.; Sundvall, J.; Bidel, S.; Kuha, S.; et al. Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: A clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010, 91, 950–957, doi:10.3945/ajcn.2009.28548.
 13. Wedick, N.M.; Brennan, A.M.; Sun, Q.; Hu, F.B.; Mantzoros, C.S.; Van Dam, R.M. Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Nutr. J.* 2011, 10, 93, doi:10.1186/1475-2891-10-93.
 14. Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A.A.; Khan, G.J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; FangFang, X.; Modarresi-Ghazani, F.; et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 97, 67–74, doi:10.1016/J.BIOPHA.2017.10.064.
 15. Gómez-Ruiz, J.Á.; Leake, D.S.; Ames, J.M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 6962–6969, doi:10.1021/jf0710985.
 16. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. Scientific Opinion on the safety of caffeine. *EFSA J.* 2015, 13, 4102.
 17. Akash, M.S.H.; Rehman, K.; Chen, S. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition* 2014, 30, 755–763, doi:10.1016/j.nut.2013.11.020.
 18. Ding, M.; Bhupathiraju, S.N.; Chen, M.; van Dam, R.M.; Hu, F.B. Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. *Diabetes Care* 2014, 37, 569–86, doi:10.2337/dc13-1203.
 19. Shang, F.; Li, X.; Jiang, X. Coffee consumption and risk of the metabolic syndrome: A meta-analysis. *Diabetes Metab.* 2016, 42, 80–87.
 20. Williams, C.J.; Fagnoli, J.L.; Hwang, J.J.; Van Dam, R.M.; Blackburn, G.L.; Hu, F.B.; Mantzoros, C.S. Coffee Consumption Is Associated With Higher Plasma Adiponectin Concentrations in Women With or Without Type 2 Diabetes A prospective cohort study. *Diabetes Care* 2008, 31, doi:10.2337/dc07.
 21. Kotani, K.; Tsuzaki, K.; Sano, Y.; Maekawa, M.; Fujiwara, S.; Hamada, T.; Sakane, N. The relationship between usual coffee consumption and serum C-reactive

- protein level in a Japanese female population. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008, 46, 1434–1437, doi:10.1515/CCLM.2008.286.
22. Lopez-Garcia, E.; Van Dam, R.M.; Qi, L.; Hu, F.B. Coffee consumption and markers of inflammation and endothelial dysfunction in healthy and diabetic women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 84, 888–893, doi:10.1093/ajcn/84.4.888.
 23. Maki, T.; Pham, N.M.; Yoshida, D.; Yin, G.; Ohnaka, K.; Takayanagi, R.; Kono, S. The relationship of coffee and green tea consumption with high-sensitivity C-reactive protein in Japanese men and women. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010, 48, 849–854, doi:10.1515/CCLM.2010.161.
 24. Martínez-González, M.A.; Fernández-Jarne, E.; Serrano-Martínez, M.; Wright, M.; Gomez-Gracia, E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004, 58, 1550–1552, doi:10.1038/sj.ejcn.1602004.
 25. Tauler, P.; Martinez, S.; Moreno, C.; Monjo, M.; Martinez, P.; Aguiló, A. Effects of caffeine on the inflammatory response induced by a 15-km run competition. *Med Sci Sport. Exerc* 2013, 45, 1269–1276, doi:10.1249/MSS.0b013e3182857c8a.
 26. Tauler, P.; Martinez, S.; Martinez, P.; Lozano, L.; Moreno, C.; Aguiló, A. Effects of Caffeine Supplementation on Plasma and Blood Mononuclear Cell IL-10 Levels After Exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2016, 8–16, doi:10.1123/ijsnem.2015-0052.
 27. Renouf, M.; Marmet, C.; Giuffrida, F.; Lepage, M.; Barron, D.; Beaumont, M.; Williamson, G.; Dionisi, F. Dose-response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, 58, 301–309, doi:10.1002/mnfr.201300349.
 28. Fitt, E.; Pell, D.; Cole, D. Assessing caffeine intake in the United Kingdom diet. *Food Chem.* 2013, 140, 421–426, doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.092.
 29. Rochat, C.; Eap, C.B.; Bochud, M.; Chatelan, A. Caffeine consumption in Switzerland: Results from the first national nutrition survey menuCH. *Nutrients* 2020, 12, 1–13, doi:10.3390/nu12010028.
 30. Sousa, A.G.; da Costa, T.H.M. Usual coffee intake in Brazil: results from the National Dietary Survey 2008–9. *Br. J. Nutr.* 2015, 113, 1615–1620, doi:10.1017/S0007114515000835.
 31. Gressner, O.A.; Lahme, B.; Rehbein, K.; Siluschek, M.; Weiskirchen, R.; Gressner, A.M. Pharmacological application of caffeine inhibits TGF- β -stimulated connective tissue growth factor expression in hepatocytes via PPAR γ and SMAD2/3-dependent pathways. *J. Hepatol.* 2008, 49, 758–767, doi:10.1016/j.jhep.2008.03.029.

32. Rebello, S.A.; Chen, C.H.; Naidoo, N.; Xu, W.; Lee, J.; Chia, K.S.; Tai, E.S.; Van Dam, R.M. Coffee and tea consumption in relation to inflammation and basal glucose metabolism in a multi-ethnic Asian population: A cross-sectional study. *Nutr. J.* 2011, 10, 61, doi:10.1186/1475-2891-10-61.
33. Pearson, T.A.; Mensah, G.A.; Alexander, R.W.; Anderson, J.L.; Cannon, R.O.; Criqui, M.; Fadl, Y.Y.; Fortmann, S.P.; Hong, Y.; Myers, G.L.; et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003, 107, 499–511, doi:10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45.
34. Moua, E.D.; Hu, C.; Day, N.; Hord, N.G.; Takata, Y. Coffee consumption and c-reactive protein levels: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2020, 12, 6–8, doi:10.3390/nu12051349.
35. Izadi, V.; Larijani, B.; Azadbakht, L. Is Coffee and Green Tea Consumption Related to Serum Levels of Adiponectin and Leptin? *Int. J. Prev. Med.* 2018, 9, 106, doi:10.4103/ijpvm.IJPVM.
36. Visser, M.; Bouter, L.M.; McQuillan, G.M.; Wener, M.H.; Harris, T.B. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *J. Am. Med. Assoc.* 1999, 282, 2131–2135, doi:10.1001/jama.282.22.2131.
37. Pou, K.M.; Massaro, J.M.; Hoffmann, U.; Vasan, R.S.; Maurovich-Horvat, P.; Larson, M.G.; Keaney, J.F.; Meigs, J.B.; Lipinska, I.; Kathiresan, S.; et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2007, 116, 1234–1241, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.710509.
38. Scherer, P.E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26746–26749, doi:10.1074/jbc.270.45.26746.
39. Kern, P.A.; Di Gregorio, G.B.; Lu, T.; Rassouli, N.; Ranganathan, G. Adiponectin expression from human adipose tissue: Relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes* 2003, 52, 1779–1785, doi:10.2337/diabetes.52.7.1779.
40. Thorand, B.; Baumert, J.; Döring, A.; Herder, C.; Kolb, H.; Rathmann, W.; Giani, G.; Koenig, W.; Wichmann, H.E.; Löwel, H.; et al. Sex differences in the relation of body composition to markers of inflammation. *Atherosclerosis* 2006, 184, 216–224, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.04.011.
41. Panagiotakos, D.B.; Pitsavos, C.; Yannakoulia, M.; Chrysohoou, C.; Stefanadis, C. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The

- ATTICA study. *Atherosclerosis* 2005, 183, 308–315, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.010.
42. Park, H.S.; Park, J.Y.; Yu, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005, 69, 29–35, doi:10.1016/j.diabres.2004.11.007.
43. Rexrode, K.M.; Pradhan, A.; Manson, J.E.; Buring, J.E.; Ridker, P.M. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. *Ann. Epidemiol.* 2003, 13, 674–682, doi:10.1016/S1047-2797(03)00053-X.
44. Day, K.; Kwok, A.; Evans, A.; Mata, F.; Verdejo-garcia, A.; Hart, K.; Ward, L.C.; Truby, H. Comparison of a Bioelectrical Impedance Device against the Reference Method Dual Energy X-Ray Absorptiometry and Anthropometry for the Evaluation of Body Composition in Adults., doi:10.3390/nu10101469.

Artículo II

Caffeine supplementation induces higher IL-6 and IL-10 plasma levels in response to a treadmill exercise test.

Rodas, Ll., Martínez, S., Aguiló, A., Tauler, P. (2020). Journal of the International Society of Sports Nutrition, 17 (1): 47. Doi: 10.1186/s12970-020-00375-4.

Caffeine supplementation induces higher IL-6 and IL-10 plasma levels in response to a treadmill exercise test

Lluís Rodas¹, Sonia Martínez^{2,3*}, Antoni Aguiló^{2,3}, Pedro Tauler^{1,3}

Abstract

Background: An acute bout of exercise induces an inflammatory response characterized by increases in several cytokines. Caffeine ingestion could modify this inflammatory response. The aim of this study was to determine the effects of caffeine supplementation on plasma levels of cytokines, mainly IL-10 and IL-6, in response to exercise.

Methods: In a randomized, crossover, double-blinded study design, thirteen healthy, well-trained recreational male athletes performed, on two different occasions, a treadmill exercise test (60 minutes at 70% VO_2max) after ingesting 6 mg/kg body mass of caffeine or placebo. Blood samples were taken before exercising, immediately after finishing and two hours after finishing the exercise. Plasma concentrations of IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-8, IL-12 and IFN- γ , adrenaline, cortisol and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) were determined. The capacity of whole blood cultures to produce cytokines in response to endotoxin (LPS) was also determined. Changes in blood variables were analyzed using a time (pre-exercise, post-exercise, recovery) x condition (caffeine, placebo) within-between subjects ANOVA with repeated measures.

Results: Caffeine supplementation induced higher adrenaline levels in the supplemented participants after exercise (257.3 ± 53.2 vs. 134.0 ± 25.7 pg·mL⁻¹, $p=0.03$) and higher cortisol levels after recovery (46.4 ± 8.5 vs. 32.3 ± 5.6 pg·mL⁻¹, $p=0.007$), but it did not influence plasma cAMP levels ($p=0.327$). The exercise test induced significant increases in IL-10, IL-6, IL-1ra, IL-4, IL-8, IL-12 and IFN- γ plasma levels, with IL-6 and IL-10 levels remaining high after recovery. Caffeine supplementation influenced only IL-6 (3.04 ± 0.40 vs. 3.89 ± 0.62 pg·mL⁻¹, $p=0.003$) and IL-10 (2.42 ± 0.54 vs. 3.47 ± 0.72 pg·mL⁻¹, $p=0.01$) levels, with higher concentrations after exercise in the supplemented condition. No effect of caffeine was observed on the *in vitro* stimulated cytokine production.

Conclusions: The results of the present study indicate a significant influence of caffeine supplementation increasing the response to exercise of two essential cytokines such as IL-6 and IL-10. However, caffeine did not influence changes in the plasma levels of other cytokines measured and the *in vitro*-stimulated cytokine production.

Key words: exercise; caffeine; inflammation; cytokines; adrenaline

*Correspondence: Sonia Martinez; e-mail: sonia.martinez@uib.es

² Research Group on Evidence, Lifestyles & Health, Department of Nursing and Physiotherapy. Research Institute on Health Sciences (IUNICS). University of the Balearic Islands, Crta de Valldemossa, Km 7.5. E-07122 Palma de Mallorca. Spain.

³ Health Research Institute of the Balearic Islands (IdISBa)

Background

Caffeine is a member of the methylxanthine family of drugs. Several studies have reported improvements in exercise performance after the ingestion of 3-6 mg/kg body mass of caffeine, particularly in endurance events when metabolic mechanisms are not limiting [1,2]. The ergogenic and stimulatory effects of caffeine, its presence in common products such as coffee, tea, and sport nutrition products, and its removal from the doping list in 2008 have contributed to its widespread consumption among athletes [3,4].

The inflammatory response to an acute bout of exercise is characterized by increases in pro- and anti-inflammatory cytokines [5]. Within this response, interleukin 10 (IL-10) has been suggested to play an essential role by limiting the production of pro-inflammatory factors [6,7]. Furthermore, it has been reported that IL-10 enhances myogenesis [8], giving more importance to the role of IL-10 in the response to exercise. However, the inflammatory response to exercise includes increases of other cytokines, mainly IL-6 [5,9]. In this regard, it has been reported that high IL-6 concentrations in response to exercise prevent increases in pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and induce the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and IL-1ra [10], conferring anti-inflammatory properties to that response [9,11].

At physiological doses, caffeine has been reported to mainly exert its effects via adenosine receptor antagonism, and in this manner acts as a powerful central nervous system stimulator and upregulates the synthesis of catecholamines such as adrenaline and noradrenaline [2,4]. Adenosine receptors are associated with intracellular pathways that influence the production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [12], a second messenger with immunomodulatory properties [13] that induces, among other cytokines, IL-10 production [14]. Therefore, any change in cAMP concentration induced by caffeine could modify this inflammatory status, mainly by modifying IL-10 production. It has also been reported that adrenaline can influence IL-6 levels by reducing its clearance by the liver [15].

It is worth mentioning that in previous studies, we reported that caffeine supplementation increases plasma IL-10 and IL-6 concentrations in response to exercise [16,17]. However, these studies were performed in two 15-km run competitions, with a lack of control on some important conditions such as participant exercise intensity and environmental conditions. The aim of this study was to determine the effects of caffeine supplementation on plasma levels of IL-10 and IL-6 in response to a nonstrenuous exercise test performed on a treadmill. To complete the description of the inflammatory response, changes induced on additional plasma cytokines such as IL-12, IL-1ra and IL-

1 β were also measured. The capacity of whole blood cultures to produce cytokines in response to endotoxin (LPS) was also determined. Considering previous results, the main hypothesis of the study was that caffeine could increase IL-10 and IL-6 circulatory concentrations in response to exercise.

Materials and methods

Participants

Thirteen healthy, well-trained, recreational male athletes took part in the study. All the subjects were informed of the purpose and demands of the study before giving their written consent to participate. The protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki for research of human subjects and was approved by the Balearic Islands Clinical Investigation Ethics Committee (reference IB 2399/14 PI).

Participants were enrolled after fulfilling all inclusion criteria and possessing none of the exclusion criteria. Subjects could be included if they were currently healthy, consumed caffeine regularly in any form (coffee, tea, soda, supplements, etc.), were between 20-45 years old, and engaged in at least 8 hours of training or competition per week. Exclusion criteria were: smokers, use of analgesic or anti-inflammatory drugs within the previous 2 weeks, habitual alcohol consumers, and presence of injury or illness incompatible with the sport practice or caffeine intake. Fourteen subjects were initially recruited, but one of them was dropped from the study, as he had only performed the main exercise in the placebo condition due to lack of availability. Table 1 shows the main characteristics of participants in the study. Participants in the study did not consume caffeine supplements, and they reported a habitual caffeine intake similar to the one that would result from 1-2 cups of coffee.

Table 1. General characteristics of participants

Parameter	
Age (yr)	36.1 \pm 6.4
Weight (kg)	75.6 \pm 7.4
Height (cm)	177.4 \pm 6.0
BMI (kg·m ⁻²)	24.1 \pm 2.2
% fat (Faulkner)	12.6 \pm 2.3
Resting heart rate (beats·min ⁻¹)	57.0 \pm 4.8
Physical activity (MET·h·wk ⁻¹)	111.1 \pm 48.9
Physical activity (sessions·wk ⁻¹)	13.5 \pm 3.1

Habitual caffeine intake (mg·day ⁻¹)	142.6 ± 96.5
Energy intake (kcal)	2917.1 ± 357.8
CHO (% total energy)	42.0 ± 3.3
Proteins (% total energy)	17.0 ± 2.3
Lipids (% total energy)	41.0 ± 4.2
VO ₂ max (ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	54.2 ± 6.1
Speed 70%VO ₂ max (km·h ⁻¹)	12.3 ± 1.3

The values are the mean ± S.D. (n=13). BMI: body mass index; MET: metabolic equivalents; wk: week.

Experimental design

A randomized, crossover, double-blinded study of supplementation with caffeine was performed. At 8-10 days before the beginning of the study, each subject performed a continuous incremental exercise test on a treadmill (H-P Cosmos, Pulsar 3, Nussdorf-Traunstein, Germany) until volitional exhaustion to determine their maximal oxygen uptake (VO₂max). The participants warmed up for 3 min at 4 km/h before starting the test. The test began at 6 km/h, and the participant work rate was increased by 1 km/h every minute until exhaustion. Each test was ended when added work did not increase or decrease the oxygen consumption, and the resulting value was recorded as the VO₂max. Expired gas was continuously analyzed (H-P Cosmos, Jaeger-MasterScreen CPX, Nussdorf-Traunstein, Germany), and heart rates (HR) were measured continuously using short-range radio telemetry (Polar Beat; Polar Electro, Oy, Finland). Level running speeds equivalent to 70% VO₂max were subsequently calculated via regression equations from the VO₂-running speed relationship. Before the exercise test, participants' height, weight and skinfolds required to measure body fat mass using the Faulkner equation were measured (triceps, abdominal, subscapular, and suprailiac).

Questionnaires to determine habitual nutritional and caffeine intake, as well as the amount of physical activity performed, were filled out while the participant was in the laboratory (by the participant himself) or were given to be completed and turned in on the first main trial day. Habitual physical activity was determined by using the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) [18], thus providing quantitative information on training loads in metabolic equivalent (MET)-h/week. Habitual nutritional intake was assessed using a self-reported 7-day food record. Mean energy, carbohydrate, protein, and lipid contents for each participant's diet were calculated using commercial software (Nutrisalud; CSG Software, Huesca, Spain) based on Spanish food

composition tables. Furthermore, habitual caffeine intake was measured with a self-reported caffeine consumption questionnaire used by our group [16,17].

Finally, each subject was given a comprehensive list of caffeine-containing foods and drinks and was instructed to abstain from these products during the 24 h preceding each exercise trial. The subjects were not allowed to use analgesic or anti-inflammatory drugs during the study protocol, and they were instructed to maintain their habitual diet, to refrain from alcohol intake and not to participate in any sporting activity during the 48 h preceding each main experimental trial.

For the main exercise trials, on two occasions one week apart, the subjects reported to the laboratory at the same hour and were randomly assigned to either the caffeine or placebo trial in a crossover random block design. The subjects were then required to empty their bladder before body mass (in shorts only) was recorded. After sitting quietly for 10 min, an initial resting blood sample was obtained from an antecubital vein by venipuncture. Following blood sampling, in the caffeine trial subjects were given $6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ body mass of caffeine dissolved in 200 ml of fruit juice drink; in the placebo trial, the subjects were given the same volume of only the fruit juice. Both drinks were matched to be similar in taste and appearance. A 24-h recall was performed to ensure that nutritional intake was similar before each trial (results not shown) and within the participants' habitual nutritional intake. After resting quietly in the laboratory for 1 hour and a short warm-up, subjects began running on the treadmill at the speed equivalent to 70% VO_2max for 60 min. Heart rates were continuously recorded, and expired air was analyzed every 20 min thereafter for control of intensity. An additional venous blood sample was obtained at immediately post-exercise before body mass (in shorts only) was recorded again. A final venous blood sample was obtained at 2 h post-exercise. For all samples, 12 ml of blood was collected, and samples were obtained with the subject in a seated position. For both trials, subjects could drink water *ad libitum*, with the water intake during the test measured. No other fluid or food intake was allowed until the blood sample had been collected at 2 h post-exercise. Laboratory conditions were 22.0 ± 0.6 °C and $54.2 \pm 6.1\%$ relative humidity.

Blood sampling and measurements

Seated venous blood samples were collected in suitable vacutainers with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or heparin as the anticoagulant. Hematocrit and hemoglobin were determined in the EDTA sample using a hematology analyzer (Horiba ABX Pentra 60, Diagnostics) for estimating plasma volume [19]. Within 30 minutes after

blood collection, plasma was obtained by centrifugation (15 min, 1,000xg, 4°C) of the EDTA-blood samples. These plasma samples were stored at -70°C until measurements were performed. Concentrations of cytokines (IL-10, IL-6, IL-8, IL-1ra, IL-4, IL-1β, IL-12 and IFN-γ), caffeine, adrenaline, cortisol and cAMP were measured in the EDTA plasma samples.

Whole heparinized blood was incubated with 10 ng/ml lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* serotype 055:B5; Sigma, St Louis, MO, USA) dissolved in culture medium (RPMI-1640 Medium, Sigma, St Louis, MO, USA), or with the same volume of culture medium (spontaneous production) for 24 hours at 37°C. Immediately after incubation, samples were centrifuged at 1,000 g for 10 min to obtain the supernatants. Aliquots were stored at -70°C until assay. Concentrations of IL-10, IL-6, IL-8, IL-1ra and TNF-α were determined in these culture supernatants. Monocyte counts were used to normalize cytokine production (difference between cytokine concentration in stimulated and unstimulated cultures) on a per cell basis [20].

Caffeine was measured in plasma by an HPLC method as previously described [16]. Adrenaline and cortisol were measured in plasma using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (Abnova Corporation, Taiwan) and (Elabscience Biotechnology Co, Ltd) respectively, with a spectrophotometric microplate reader (PowerWavei; BioTek, Winooski, VT). cAMP concentrations were determined in plasma using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (Arbor Assays) with a spectrophotometric microplate reader (PowerWavei; BioTek, Winooski, VT).

Cytokine concentrations were determined in plasma and in culture supernatants using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), with a spectrophotometric microplate reader.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Statistics 23.0 for windows). The results are expressed as the means and standard deviations (S.D.), and $p < 0.05$ was considered statistically significant for all analysis. All the data were tested for their normal distribution (Shapiro-Wilk test). If the data were not normally distributed, statistical analysis was carried out on the logarithmic transformation of the data (cytokine, adrenaline, and cortisol concentrations). Exercise-related parameters (weight lost, maximum and average HR) under both conditions, placebo and supplemented, were compared using a t-test for

unpaired data. Changes in blood variables during the study were analyzed using a time (pre-exercise, post-exercise, recovery) x condition (caffeine, placebo) within-between subjects ANOVA with repeated measures. Any significant F ratios subsequently shown were assessed using post hoc comparisons with Holm-Bonferroni correction for multiple comparisons applied to the unadjusted p value. Multiple linear regression models for IL-10 and IL-6 (logarithmic transformed) were also analyzed. Independent variables considered were time (pre-exercise, post-exercise, recovery), condition (caffeine, placebo) and adrenaline concentrations. The IL-10 model also included IL-6 as an independent variable.

Results

Characteristics of the main exercise trials

No differences were found between changes induced by exercise in the placebo and in supplemented conditions in weight loss (1.36 ± 0.43 vs. 1.38 ± 0.35 kg, $p=0.876$), water intake during the test (271 ± 88 vs. 292 ± 102 mL, $p=0.627$), average HR (159 ± 15 vs. 163 ± 15 beats·min⁻¹, $p=0.678$) and maximum HR (168 ± 12 vs. 174 ± 12 beats·min⁻¹, $p=0.198$).

Plasma concentrations of caffeine, cAMP, adrenaline and cortisol

Plasma levels of caffeine and cAMP pre-exercise, post-exercise and after the 2-hour recovery are shown in Table 2. Plasma caffeine was only detected in the supplemented condition after supplementation, with similar levels post-exercise and after recovery. cAMP plasma levels were only influenced by time ($p<0.001$), with higher values post-exercise ($p<0.001$).

A significant interaction (time x condition) for plasma adrenaline concentration ($p=0.029$) was observed (Figure 1). Plasma adrenaline increased post-exercise in both conditions (placebo $p=0.002$; supplemented $p=0.003$), with significantly higher values in the supplemented subjects ($p=0.030$).

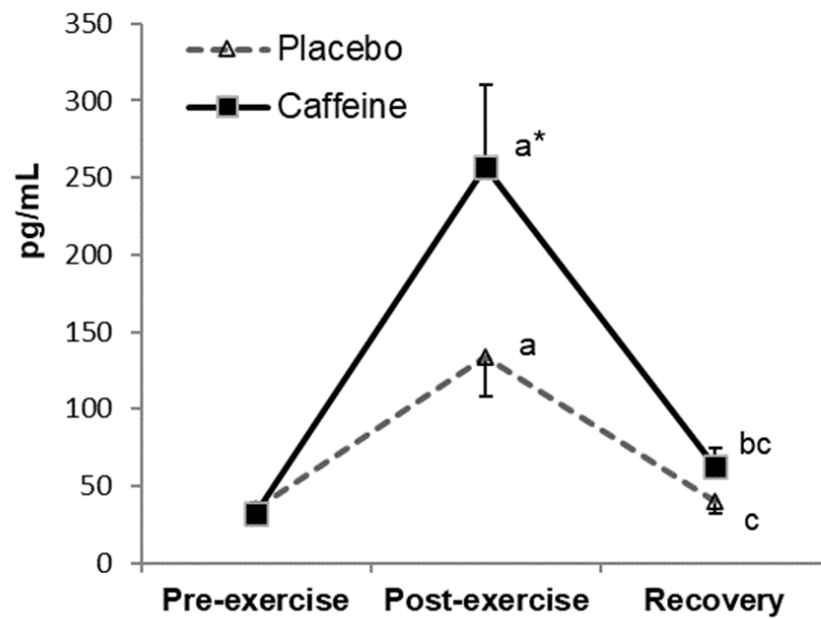


Fig 1 Changes in plasma adrenaline concentrations during exercise and recovery following caffeine supplementation. The values are the mean and S.D. (n=13). p value (time): <0.001; p value (condition): 0.030; p value (interaction): 0.029; * indicates significant differences between conditions at that time point; ^a indicates significant differences post-exercise vs. pre-exercise; ^b indicates significant differences recovery vs. pre-exercise; ^c indicates significant differences recovery vs. post-exercise.

A significant interaction was also found for plasma cortisol concentrations ($p=0.017$) (Figure 2). Post-recovery plasma cortisol concentrations were higher in the supplemented than in the placebo condition ($p=0.007$), with values in the supplemented condition still higher than the pre-exercise values ($p=0.001$).

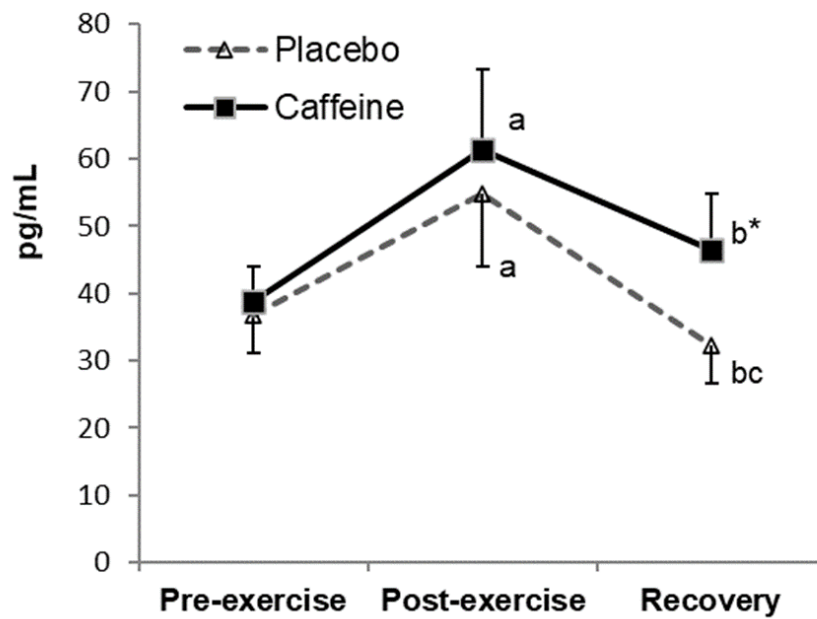


Fig. 2 Changes in plasma cortisol concentrations during exercise and recovery following caffeine supplementation. The values are the mean and S.D. (n=13). p value (time): <0.001; p value (condition): 0.036; p value (interaction): 0.017; * indicates significant differences between conditions at that time point; ^a indicates significant differences post-exercise vs. pre-exercise; ^b indicates significant differences recovery vs. pre-exercise; ^c indicates significant differences recovery vs. post-exercise.

Circulating white blood cell counts

Table 2 also shows the changes in the leukocyte numbers after exercise and recovery. A significant interaction time x condition was found for the leukocyte number (p=0.048). Leukocytes increased post-exercise (p<0.001 for both conditions) and remained high during recovery. Values both post-exercise (p=0.007) and post-recovery (p=0.011) were significantly higher in the supplemented than in the placebo condition. A significant time x condition interaction was also found for the lymphocyte number (p=0.006). The number of circulating lymphocytes increased significantly post-exercise (placebo p=0.001, supplemented p<0.001), with significantly higher values in the supplemented condition than in the placebo value (p=0.021).

Table 2. Changes in blood cell counts, plasma caffeine levels and cAMP during exercise and recovery following caffeine supplementation

	Pre-exercise	Post-exercise	Recovery	Main effect p-values (T; C; TxC)
Caffeine ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Placebo	n.d.	n.d.	n.d.	<0.001 <0.001; <0.001 ^{a,b}
Caffeine	n.d.	8.99 \pm 1.80 *	8.38 \pm 2.40 *	
AMPc ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Placebo	126.5 \pm 15.5	174.5 \pm 15.4	131.8 \pm 19.2	<0.001 ^a ; 0.327; 0.742
Caffeine	126.2 \pm 17.4	178.8 \pm 23.6	137.6 \pm 21.4	
Leukocytes ($10^3\cdot\mu\text{L}^{-1}$)				
Placebo	6.21 \pm 1.43	8.30 \pm 1.68	8.80 \pm 2.58	<0.001; 0.002; 0.048 ^{a,b}
Caffeine	6.66 \pm 1.69	9.86 \pm 2.51 *	10.2 \pm 3.2 *	
Neutrophils ($10^3\cdot\mu\text{L}^{-1}$)				
Placebo	3.20 \pm 0.68	4.51 \pm 0.90	6.16 \pm 1.83	<0.001 ^{a,b} ; 0.002; 0.175
Caffeine	3.72 \pm 1.08	5.64 \pm 1.61	7.63 \pm 2.38	
Lymphocytes ($10^3\cdot\mu\text{L}^{-1}$)				
Placebo	2.27 \pm 0.53	3.00 \pm 0.69	1.89 \pm 0.40	<0.001; 0.262; 0.006 ^{a,b,c}
Caffeine	2.33 \pm 0.49	3.34 \pm 0.78 *	1.80 \pm 0.36	
Monocytes ($10^3\cdot\mu\text{L}^{-1}$)				
Placebo	0.50 \pm 0.11	0.54 \pm 0.14	0.54 \pm 0.14	0.028 ^a ; 0.383; 0.287
Caffeine	0.47 \pm 0.09	0.59 \pm 0.20	0.58 \pm 0.21	

The values are the mean \pm S.D. (n=13). T: time (pre-exercise, post-exercise, recovery); C: condition (placebo, caffeine); TxC: interaction time x condition. * indicates significant differences between conditions at that time point; ^a indicates significant differences post-exercise vs. pre-exercise; ^b indicates significant differences recovery vs. pre-exercise; ^c indicates significant differences recovery vs. post-exercise.

Plasma cytokine concentrations

A significant time x condition interaction ($p=0.016$) was found for IL-10 plasma concentrations (Figure 3). IL-10 levels increased post-exercise in both conditions (placebo $p<0.001$, supplemented $p=0.001$), with significantly higher values in the supplemented than in the placebo condition ($p=0.01$). These values remained high after recovery (placebo $p=0.022$, supplemented $p=0.006$), with higher concentrations in the supplemented condition ($p=0.001$).

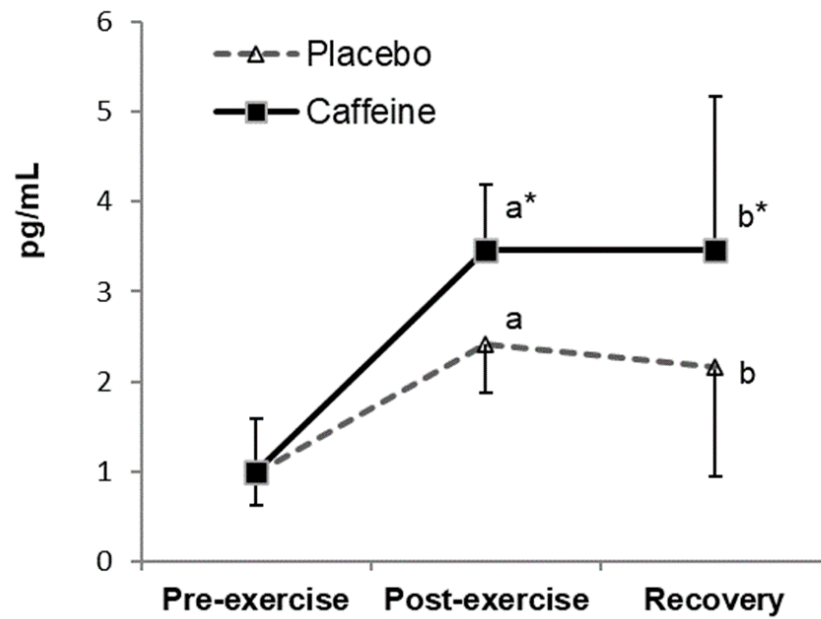


Fig. 3 Changes in plasma IL-10 concentrations during exercise and recovery following caffeine supplementation. The values are the mean and S.D. (n=13). p value (time): 0.003; p value (condition): 0.001; p value (interaction): 0.016; * indicates significant differences between conditions at that time point; ^a indicates significant differences post-exercise vs. pre-exercise; ^b indicates significant differences recovery vs. pre-exercise.

Figure 4 shows the changes in IL-6 levels in plasma. A significant time x condition interaction ($p=0.017$) was found, with increased values post-exercise (placebo $p=0.002$, supplemented $p=0.003$) that were higher in the supplemented than those in the placebo condition ($p=0.003$).

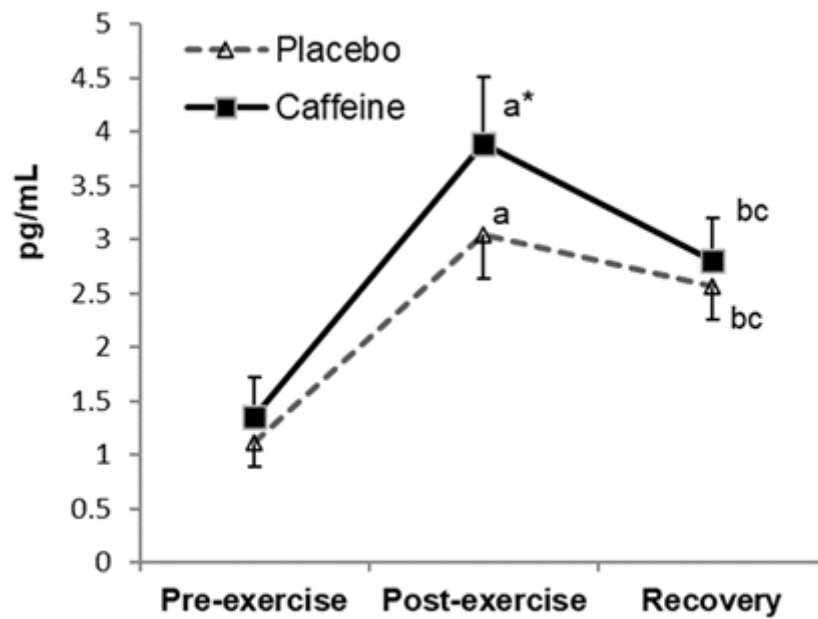


Fig. 4 Changes in plasma IL-6 concentrations during exercise and recovery following caffeine supplementation. The values are the mean and S.D. (n=13). p value (time): <0.001; p value (condition): 0.011; p value (interaction): 0.017; * indicates significant differences between conditions at that time point; ^a indicates significant differences post-exercise vs. pre-exercise; ^b indicates significant differences recovery vs. pre-exercise; ^c indicates significant differences recovery vs. post-exercise.

A significant effect of time was observed for IL-1ra, IL-4, IL-8, IL-12 and IFN- γ (Table 3), with increased post-exercise values for IL-1ra ($p=0.026$), IL-4 ($p=0.001$), IL-8 ($p<0.001$), and IL-12 ($p=0.001$).

Table 3. Changes in plasma cytokine concentrations during exercise and recovery following caffeine supplementation

	Pre-exercise	Post-exercise	Recovery	Main effect p-values (T; C; TxC)
IL-8 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Placebo	48.6 \pm 4.1	59.1 \pm 5.0	50.2 \pm 4.6	<0.001 ^a ; 0.475; 0.290
Caffeine	49.8 \pm 4.6	63.7 \pm 4.4	48.6 \pm 3.6	
IL-1β ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Placebo	17.1 \pm 2.7	17.4 \pm 2.7	14.6 \pm 3.2	0.217; 0.600; 0.293
Caffeine	16.6 \pm 2.7	19.6 \pm 3.0	14.8 \pm 1.8	
IL-12 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Placebo	91.9 \pm 6.6	113.1 \pm 9.5	91.4 \pm 15.1	0.007 ^a ; 0.563; 0.742
Caffeine	91.6 \pm 7.8	117.7 \pm 9.0	77.4 \pm 4.4	
IL-1ra ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Placebo	2.21 \pm 0.35	2.58 \pm 0.52	2.30 \pm 0.33	0.026 ^a ; 0.577; 0.307
Caffeine	2.28 \pm 0.40	2.63 \pm 0.34	2.18 \pm 0.55	
IL-4 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Placebo	1.74 \pm 0.20	1.96 \pm 0.21	1.56 \pm 0.16	<0.001 ^a ; 0.522; 0.070
Caffeine	1.60 \pm 0.15	2.24 \pm 0.24	1.60 \pm 0.18	
IFN-γ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
Placebo	5.28 \pm 0.41	6.10 \pm 0.51	5.07 \pm 0.67	0.015 ^a ; 0.493; 0.587
Caffeine	4.73 \pm 0.44	6.03 \pm 0.23	4.86 \pm 0.27	

The values are the mean \pm S.D. (n=13). T: time (pre-exercise, post-exercise, recovery); C: condition (placebo, caffeine); TxC: interaction time x condition. Main effect for time: ^a indicates significant differences post-exercise vs. pre-exercise.

Multivariable linear regression analysis

Table 4 shows the three regression models obtained for IL-10. The regression analysis showed that IL-6 was the main predictor for IL-10 plasma concentrations ($p < 0.001$). Time ($p = 0.001$) and condition ($p = 0.017$) factors were also found to be significant predictors. No significant effect of adrenaline was found.

Table 4. Multivariable linear regression models for IL-10 with time, condition, adrenaline and IL-6 as independent factors

	Model 1		Model 2		Model 3	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value
Input variable						
Time			0.314	0.002	0.329	0.001
Condition					0.218	0.017
Adrenaline						n.s.
IL-6	0.547	<0.001	0.416	<0.001	0.379	<0.001
R²	0.300		0.381		0.427	
Adjusted R²	0.290		0.364		0.404	
F value	32.496	<0.001	23.070	<0.001	18.396	<0.001
R² change	0.300		0.081		0.046	
F change	32.496	<0.001	9.856	0.002	5.984	0.017

β values for significant predictors in each model are provided in the coefficient column. n.s.: non-significant effect of this factor in any model. Logarithmic transformations of IL-10, IL-6 and adrenaline were used.

Table 5 shows the two regression models obtained for IL-6. Adrenaline was found to be the main predictor for IL-6 concentrations ($p < 0.001$). The factor time was also found to be a significant predictor ($p < 0.001$). No significant effect of the condition was found.

Table 5. Multivariable linear regression models for IL-6 with time, condition and adrenaline as independent factors

	Model 1		Model 2	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value
Input variable				
Time			0.385	<0.001
Condition				n.s.
Adrenaline	0.560	<0.001	0.537	<0.001
R²	0.314		0.462	
Adjusted R²	0.305		0.447	
F value	34.775	<0.001	32.147	<0.001
R² change	0.314		0.148	
F change	34.775	<0.001	20.567	<0.001

β values for significant predictors in each model are provided in the coefficient column. n.s.: non-significant effect of this factor in any model. Logarithmic transformation of IL-6 and adrenaline were used.

Stimulated cytokine production

When the stimulated cytokine production normalized to monocyte number values was considered (Table 6), an effect of time on the IL-1ra concentrations was observed ($p=0.002$). The IL-1ra values post-recovery were higher than the pre-exercise ($p=0.005$) and the post-exercise ($p=0.02$) values.

Table 6. Changes in stimulated cytokine production during exercise and recovery following caffeine supplementation

	Pre-exercise	Post-exercise	Recovery	Main effect p-values (T; C; TxC)
IL-10 ($\text{pg} \cdot 10^3 \text{ monocytes}^{-1}$)				
Placebo	1.11 \pm 0.59	1.28 \pm 0.66	1.36 \pm 0.88	0.493; 0.644; 0.067
Caffeine	1.30 \pm 0.79	1.43 \pm 0.87	1.16 \pm 0.67	
IL-6 ($\text{pg} \cdot 10^3 \text{ monocytes}^{-1}$)				
Placebo	242 \pm 164	304 \pm 224	310 \pm 275	0.148; 0.744; 0.991
Caffeine	251 \pm 152	312 \pm 227	323 \pm 251	
TNF- α ($\text{pg} \cdot 10^3 \text{ monocytes}^{-1}$)				
Placebo	13.1 \pm 6.4	13.3 \pm 6.2	13.7 \pm 10.8	0.493; 0.255; 0.217
Caffeine	14.5 \pm 7.0	10.8 \pm 5.8	11.1 \pm 6.1	
IL-1ra ($\text{pg} \cdot 10^6 \text{ monocytes}^{-1}$)				
Placebo	16.9 \pm 12.8	21.7 \pm 12.2	41.7 \pm 32.4	0.002 ^{a,b} ; 0.458; 0.794
Caffeine	19.7 \pm 9.4	24.2 \pm 10.8	42.6 \pm 28.4	
IL-8 ($\text{pg} \cdot 10^3 \text{ monocytes}^{-1}$)				
Placebo	17.6 \pm 6.5	22.4 \pm 11.6	20.1 \pm 12.3	0.343; 0.312; 0.522
Caffeine	19.3 \pm 7.3	20.3 \pm 10.3	14.5 \pm 8.9	

The values are the mean \pm S.D. ($n=13$). T: time (pre-exercise, post-exercise, recovery); C: condition (placebo, caffeine); TxC: interaction time \times condition. Main effect for time: ^a indicates significant differences recovery vs. pre-exercise; ^b indicates significant differences recovery vs. post-exercise.

Discussion

The main finding of the present study was that caffeine supplementation induced higher IL-6 and IL-10 plasma concentrations in response to a treadmill exercise test performed at 70% VO_2max . However, no effect of caffeine was observed in the responses of other anti-inflammatory (IL-1ra, IL-4) and pro-inflammatory (IL-12, IL-1 β , IL-8, IFN- γ) cytokines.

In agreement with previous studies, IL-6 increased post-exercise [5,9]. However, the increase observed was lower than those reported after longer and/or more intense exercises that compromise muscle glycogen availability [9]. In this study, a moderate exercise protocol performed by well-trained recreational athletes was used to highlight the effects of caffeine, avoiding the effects of muscle low energetic availability. Furthermore, this moderate exercise, rather than the strenuous ones, could reflect more properly a healthy exercise model. In agreement with a few previous studies [16,17,21,22], higher IL-6 increases post-exercise in caffeine-supplemented athletes were observed in the present study. These higher increases in IL-6 after caffeine supplementation have been mainly attributed to a decreased clearance of IL-6 by the liver [15] due to the adrenaline-induced decrease in splanchnic blood flow [23]. In agreement with this suggestion, higher adrenaline concentrations were observed post-exercise in the supplemented participants, which could have been induced by this decreased clearance. Furthermore, the regression analysis showed that adrenaline was the main predictor for IL-6. These observations could confirm the adrenaline-induced decreased clearance as the main reason for increased IL-6 levels after caffeine supplementation.

As for IL-6, increases in IL-10 after exercise have been reported [24,25], which is in agreement with the results of the present study. It is noteworthy that the increase in the caffeine-supplemented participants was higher than the increase observed in the placebo condition, which is in agreement with our previous results [16,17]. A possible role for cAMP in these increased IL-10 levels was not found because no differences were observed between groups in post-exercise plasma cAMP levels. It has been reported that acute increases in IL-6 stimulate the production of IL-10 [10]. However, this mechanism has only been shown when IL-6 levels are much higher than the ones observed in this study [10]. Despite this last observation, in the present study, the regression analysis showed that IL-6 was the main predictor for IL-10 levels. Therefore, it seems that changes in IL-10 levels, including differences between conditions, could be attributed, at least in part, to IL-6 changes. It is noteworthy that the lack of differences between conditions in the IL-1ra response to exercise are not in agreement with this

mechanism because it was suggested that IL-6 levels induce not only IL-10 but also IL-1ra production in response to exercise stimulus [10]. More studies are required to properly clarify this issue.

The possibility that higher IL-10 levels post-exercise in caffeine-supplemented participants were due to a decrease in IL-10 clearance was also tested using regression analysis. In this regard, it has been reported that the kidney contributes significantly to IL-10 clearance [26,27], and adrenaline decreases renal blood flow [28]. Therefore, the higher adrenaline levels in the caffeine-supplemented participants could lead to a lower IL-10 renal clearance and, therefore, to higher plasma levels in this supplemented condition. However, the regression analysis performed showed that IL-10 levels were not related to adrenaline. Therefore, it seems that, in contrast with IL-6, this mechanism would not contribute significantly to increased IL-10 levels in the caffeine condition.

Recent reports have suggested that caffeine could exert an anti-inflammatory effect by inhibiting acetylcholinesterase activity and therefore, maintaining higher levels of acetylcholine, a suppressor of pro-inflammatory cytokines [29–31]. The results obtained in the present study did not support this mechanism because the response of pro-inflammatory cytokines, such as IL-8 and IFN- γ , to exercise was similar in the supplemented and in the placebo conditions. Thus, it seems that at least in response to this moderate exercise, the mechanisms leading to the suggested caffeine anti-inflammatory effects would be related to higher IL-10 levels rather than to an inhibition of pro-inflammatory cytokines. It is worth mentioning that higher IL-10 levels in caffeine-supplemented participants could suppose a healthier anti-inflammatory effect of exercise. In this regard, it has been suggested that the healthy anti-inflammatory effects of physical activity counteracting low-grade systemic inflammation are due in part to the increased release of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, after each acute exercise session [32]. Higher cortisol levels in the caffeine-supplemented participants found in the present study could also suppose a higher anti-inflammatory effect because it has been reported that cortisol exerts potent anti-inflammatory actions [33].

In the present study, no effects of caffeine supplementation on the LPS-stimulated *in vitro* cytokine production post-exercise were observed. It is noteworthy that only a few previous studies have used similar approaches when caffeine effects during exercise were analyzed [22,34,35], but none of them have yet measured cytokine-stimulated production. The results obtained in the present study could be in agreement with the lack of effect of caffeine supplementation on the blood mononuclear cell cytokine levels in response to exercise observed previously [17]. Several *in vitro* studies have shown that caffeine can modulate various aspects of both innate and adaptive immunity,

including cytokine production by different cellular lines and tissues [13]. However, these studies used caffeine concentrations much higher than the physiological ones and the ones present in the blood cell cultures in the present study (approximately 3 µg/mL or 15 µM). The very slight effect of exercise on stimulated cytokine production is in agreement with previous reports [20] and, among other factors, could reflect the not-very demanding characteristic of the exercise performed.

Some limitations of this study should be acknowledged. This study considered only males; it would be interesting to analyze the effects of caffeine supplementation in females and in older participants. Furthermore, it would also be interesting to determine whether the effects of caffeine observed in the present study were maintained in exercise tests of different durations and/or intensities, mainly in more demanding exercises. More studies are needed to determine the sources of increased cytokine concentrations post-exercise, mainly the source of higher IL-10 levels in caffeine-supplemented participants.

Conclusions

Caffeine supplementation induced higher post-exercise circulatory levels of IL-10 and IL-6. Those caffeine-induced higher IL-10 levels could suppose an enhancement of the anti-inflammatory and health-enhancing attributes of exercise; nonetheless, more studies are necessary to determine the concrete mechanisms leading to these increased levels and their consequences. The lack of caffeine effects on other cytokines and/or stimulated cytokine production did not allow the establishment of a general anti-inflammatory effect of caffeine.

Abbreviations

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharide; VO₂max: Maximal oxygen uptake; HR: Heart Rate; MET: Metabolic equivalents; BMI: Body Mass Index; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; ANOVA: Analysis of variance

Acknowledgements

We would like to thank all the participants in the study.

Authors' contributions

PT and SM conceived and designed the study. LR, SM, PT and AG collected data. LR, SM, AG and PT analyzed data and reported results. LR and PT constructed the first manuscript. All authors edited the manuscript and approved the final version of manuscript.

Funding

We acknowledge the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO), the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the European Regional Development Funds (ERDF) for its support to the project DEP2013-45966-P (MINECO/AEI/ERDF, EU).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

All the subjects were informed of the purpose and demands of the study before giving their written consent to participate. The protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki for research of human subjects and was approved by the Balearic Islands Clinical Investigation Ethics Committee (reference IB 2399/14 PI).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Research Group on Evidence, Lifestyles & Health, Department of Fundamental Biology and Health Sciences. Research Institute on Health Sciences (IUNICS). University of the Balearic Islands. Crta de Valldemossa, Km 7.5. E-07122 Palma de Mallorca. Spain.

² Research Group on Evidence, Lifestyles & Health, Department of Nursing and Physiotherapy. Research Institute on Health Sciences (IUNICS). University of the Balearic Islands, Crta de Valldemossa, Km 7.5. E-07122 Palma de Mallorca. Spain.

³ Health Research Institute of the Balearic Islands (IdISBa)

References

1. Doherty M, Smith PM. Effects of caffeine ingestion on rating of perceived exertion during and after exercise: a meta-analysis. *Scand J Med Sci Sport* [Internet]. 2005/03/19. 2005;15:69–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15773860
2. Graham TE. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sport Med* [Internet]. 2001/10/05. 2001;31:785–807. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11583104
3. Chester, N., Wojek N. Caffeine consumption amongst British athletes following changes to the 2004 WADA prohibited list. *Int J Sports Med*. 2008;29:524–8.
4. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zwartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* [Internet]. 1999/03/02. 1999;51:83–133. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10049999
5. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* [Internet]. 2000;80:1055–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10893431
6. Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev* [Internet]. 2009/01/24. 2008;226:219–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19161427
7. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2001/03/13. 2001;19:683–765. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11244051
8. Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol* [Internet]. 2012/08/31. 2012;189:3669–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22933625
9. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil* [Internet]. 2003/11/12. 2003;24:113–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14609022
10. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:E433–7.

11. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, Keller C, Fischer C, Hiscock N, et al. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch* [Internet]. 2003;446:9–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12690457
12. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* [Internet]. 2003/07/02. 2003;15:813–27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12834807
13. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol Ther* [Internet]. 2006;111:877–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16540173
14. Eigler A, Siegmund B, Emmerich U, Baumann KH, Hartmann G, Endres S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol*. 1998;63:101–7.
15. Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, Steensberg A, Keller C, Krstrup P, et al. Hepatosplanchnic clearance of interleukin-6 in humans during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2003/07/15. 2003;285:E397-402. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12857677
16. Tauler P, Martinez S, Moreno C, Monjo M, Martinez P, Aguiló A. Effects of caffeine on the inflammatory response induced by a 15-km run competition. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2013/01/10. 2013;45:1269–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23299767
17. Tauler P, Martinez S, Martinez P, Lozano L, Moreno C, Aguiló A. Effects of Caffeine Supplementation on Plasma and Blood Mononuclear Cell IL-10 Levels After Exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* [Internet]. 2016;8–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132827>
18. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2003 [cited 2014 Jul 9];35:1381–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900694>
19. Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* [Internet]. 1974/08/01. 1974;37:247–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4850854
20. Abbasi A, Fehrenbach E, Hauth M, Walter M, Hudemann J, Wank V, et al. Changes in spontaneous and Ips-induced ex vivo cytokine production and mrna expression in male and female athletes following prolonged exhaustive exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2013;19:8–28.
21. Mana VM, Fett CA, Salicio MA, Brandão CFCCM, Stoppiglia LF, Fett WCR, et al.

The effect of caffeine supplementation on trained individuals subjected to maximal treadmill test. *African J Tradit Complement Altern Med*. 2017;14:16–23.

22. Walker GJ, Finlay O, Griffiths H, Sylvester J, Williams M, Bishop NC. Immunoendocrine response to cycling following ingestion of caffeine and carbohydrate. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2007/09/07. 2007;39:1554–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17805088

23. Takala J. Determinants of splanchnic blood flow. *Br J Anaesth* [Internet]. 1996/07/01. 1996;77:50–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8703630

24. Nieman DC, Henson DA, Smith LL, Utter AC, Vinci DM, Davis JM, et al. Cytokine changes after a marathon race. *J Appl Physiol* [Internet]. 2001/06/16. 2001;91:109–14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11408420

25. Zaldivar F, Wang-Rodriguez J, Nemet D, Schwindt C, Galassetti P, Mills PJ, et al. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol* [Internet]. 2005/12/17. 2006;100:1124–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16357073

26. Huhn RD, Radwanski E, O'Connell SM, Sturgill MG, Clarke L, Cody RP, et al. Pharmacokinetics and immunomodulatory properties of intravenously administered recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Blood*. 1996;87:699–705.

27. Yilmaz MI, Solak Y, Saglam M, Cayci T, Acikel C, Unal HU, et al. The relationship between IL-10 levels and cardiovascular events in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. American Society of Nephrology; 2014;9:1207–16.

28. Physiologic Control of Glomerular Filtration and Renal Blood Flow [Internet]. [cited 2020 Mar 21]. Available from: https://www.brainkart.com/article/Physiologic-Control-of-Glomerular-Filtration-and-Renal-Blood-Flow_19402/

29. Pohanka M, Dobes P. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *Int J Mol Sci*. 2013;14:9873–82.

30. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med*. 2009;265:663–79.

31. Barcelos R, Souza M, Amaral G, Stefanello S, Bresciani G, Figuera M, et al. Caffeine Intake May Modulate Inflammation Markers in Trained Rats. *Nutrients* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014 [cited 2019 Nov 26];6:1678–90. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/6/4/1678>

32. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011/08/06. 2011;11:607–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21714240

on&list_uids=21818123

33. Cupps TR, Fauci AS. Corticosteroid-Mediated Immunoregulation in Man. *Immunol Rev* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1982 [cited 2020 Mar 23];65:133–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.1982.tb00431.x>

34. Fletcher DK, Bishop NC. Caffeine ingestion and antigen-stimulated human lymphocyte activation after prolonged cycling. *Scand J Med Sci Sport*. 2012;22:249–58.

35. Fletcher DK, Bishop NC. Effect of a high and low dose of caffeine on antigen-stimulated activation of human natural killer cells after prolonged cycling. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* [Internet]. 2011/05/12. 21:155–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21558577

Capítulo 5: DISCUSIÓN

El principal resultado de la presente tesis es que la cafeína induce mayores aumentos de IL-6 e IL-10 en respuesta a un ejercicio puntual no extenuante, provocando que esta respuesta tenga un carácter más antiinflamatorio. Sin embargo, cuando se analizó la combinación de actividad física e ingesta habitual de cafeína, se observó como otros factores, como el sedentarismo y el acúmulo de grasa en el organismo, ejercían una influencia más importante sobre el estado inflamatorio del organismo, con asociaciones entre un mayor estado proinflamatorio y el acúmulo de grasa, por una parte, y con el comportamiento sedentario por otra. En este sentido, la ingesta habitual de cafeína se asoció con un ligero efecto antiinflamatorio, caracterizado por concentraciones inferiores de PCR.

La cantidad promedio de cafeína consumida al día fue de 164 mg, valores ligeramente inferiores a los observados en otros estudios [6, 7, 276], con el café como principal fuente de cafeína, tendencia habitual en los países europeos, exceptuando Gran Bretaña e Irlanda [7]. Considerando que en España las preparaciones de café son relativamente diferentes a las de otros países, se mantuvo la ingesta de cafeína, y no la de café, como la variable dependiente en el análisis, ya que supone un parámetro más fácilmente comparable con los resultados de estudios previos. Sin embargo, el hecho de que el café sea la fuente alimentaria mayoritaria de cafeína, suponiendo en torno al 67%, permite establecer un paralelismo entre ingesta de cafeína e ingesta de café, usando la ingesta de cafeína como un indicador del consumo de café.

En el presente estudio se ha observado una asociación negativa entre consumo de cafeína y niveles de PCR, lo que indica un efecto antiinflamatorio del consumo de cafeína, o de otros componentes de los alimentos que aportan la cafeína, principalmente el café. Algunos estudios previos han observado un efecto protector del consumo del café en cantidades de, al menos, una taza diaria, reduciendo los niveles de PCR [264-266]. Es destacable que en uno de estos estudios se observara dicha disminución de los niveles de PCR con el consumo de café descafeinado [265]. De acuerdo con los efectos antiinflamatorios de los ACGs descritos previamente, esto indicaría que estos componentes que también se encuentran en el café, jugarían un papel clave en este efecto antiinflamatorio, disminuyendo, en este caso, los niveles de PCR. De hecho, se han atribuido propiedades antioxidantes y antiinflamatorias a los ACGs, presentes en cantidades significativas en el café [240]. El IMC de los sujetos en el presente estudio, de media correspondientes a peso saludable (24,3 kg/m² en hombres y 22,0 kg/m² en mujeres) podría haber influido en que se diera la asociación entre consumo de cafeína,

como indicador del consumo de café, y bajos niveles de PCR, ya que estudios previos que encontraron esta asociación también fueron desarrollados en poblaciones con un IMC de estas características [264-266]. Por tanto, en este sentido se confirmaría la existencia de esta asociación entre mayor consumo de café y concentraciones menores de PCR cuando los valores de IMC están en el rango del normopeso.

La adiponectina, es una adipoquina con características antiinflamatorias cuyos niveles dependen del sexo, con concentraciones superiores en mujeres. Esto ocurre a pesar de que un aumento de los depósitos de grasa corporal se asocia con un ambiente más proinflamatorio, motivo por el cual puede resultar paradójico que las mujeres, aun teniendo mayores porcentajes de grasa corporal que los hombres, presenten una mayor cantidad de adiponectina, resultados que concuerdan con otros estudios [106]. El motivo, pese a no estar del todo elucidado, podría deberse a una cuestión hormonal, dado que se ha detallado una relación inversa entre niveles de andrógenos y valores plasmáticos de adiponectina [107]. Por otro lado, de forma general, se han observado asociaciones entre el consumo de café y concentraciones superiores de adiponectina, pero solo cuando la ingesta de café era elevada (con equivalencias que llegaban a 600 mg de cafeína) [256-258, 264]. Así, el consumo de café por parte de las personas de estos estudios era elevado, por ejemplo 5 cafés/día [257] o un consumo progresivo desde 1 taza a 8 tazas al día [256] durante 2-3 meses. Estas observaciones demostrarían que para aumentar los niveles de adiponectina se requieren cantidades de café o cafeína superiores a las observadas en el estudio observacional de esta tesis. En este caso, se ha sugerido que el efecto está producido por la cafeína, estimulando la expresión del PPAR γ , lo que induce el aumento de las concentraciones de adiponectina [263]. Además de la cantidad superior de cafeína necesaria [264], parece ser que el efecto en personas con sobrepeso o de edad avanzada es mayor que en población con normopeso y más joven [257, 258, 265], lo que también contribuiría a explicar que no se observara asociación en el presente estudio, con una población joven y un IMC dentro de la categoría normopeso.

De la misma forma que el limitado consumo de café o cafeína, en comparación con otros estudios, observado en el presente estudio podría ser la causa de la falta de asociación con la adiponectina, también se podría atribuir a este inferior consumo el hecho de que no se observe asociación entre ingesta de cafeína y las concentraciones de otros marcadores de inflamación y, en concreto, de la IL-10. En este caso, en tres de los cuatro tipos de receptores de adenosina, la Kd para la cafeína es más elevada que la concentración de cafeína que correspondería a la ingesta determinada en las personas participantes en el estudio, y esto provocaría una falta de interacción entre la

cafeína y dichos receptores de adenosina. Por tanto, en general, los resultados obtenidos muestran que mientras la cafeína, o el café, ejerce un ligero efecto antiinflamatorio en la población joven, considerada sana en el estudio, tanto el sedentarismo como el acúmulo de grasa son predictores mucho más importantes del estado inflamatorio del organismo, con efectos proinflamatorios de ambos factores. Sin embargo, también es destacable que la actividad física ejercía un efecto muy limitado.

En relación con las asociaciones con los indicadores de cantidad de grasa utilizados, es importante considerar que estas asociaciones se han encontrado en una población en conjunto dentro del normopeso, con un porcentaje de solo el 20,5% de personas con sobrepeso y el 3,7% con obesidad según sus valores de IMC. En este sentido se ha observado como el contenido de grasa corporal es un predictor positivo de los niveles de PCR, y un predictor negativo de los marcadores antiinflamatorios IL-10 y adiponectina. Además, el nivel de grasa visceral se encontró como predictor positivo de los niveles de IL-6 y de TNF- α .

El aumento de los niveles de grasa en el organismo se ha asociado con concentraciones menores de marcadores antiinflamatorios, como la IL-10 y la adiponectina, y concentraciones superiores de marcadores proinflamatorios como TNF α e IL-6 [108]. Este aumento de grasa corporal se ha relacionado con un aumento del tamaño de los adipocitos, lo que inicia el proceso de reclutamiento de macrófagos tipo M1, cuyo fenotipo tiene características proinflamatorias, que lleva asociado un aumento de marcadores como TNF α e IL-6, y una disminución de macrófagos M2, con características antiinflamatorias, lo que provoca un descenso de IL-10 [121], con el consecuente desarrollo de inflamación sistémica crónica de bajo nivel [102, 108]. Siguiendo con los depósitos de grasa corporal, parece que, de forma concreta, la cantidad de grasa visceral jugaría un papel importante, estando implicada en los procesos inflamatorios, dado que encontramos una asociación positiva global entre niveles de grasa visceral y TNF α , así como con IL-6, tal y como observan otros autores [108, 277-279], lo que ha llevado a proponer un papel significativo de este depósito concreto de grasa como inductor de un estado más proinflamatorio. Además, un aumento de la grasa visceral se relaciona con hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, iniciándose el proceso conocido como estrés oxidativo, el cual va asociado a otros problemas como hiperlipidemia o hiperglucemia. Este estrés oxidativo se produce debido al desequilibrio de la balanza entre ROS y los mecanismos antioxidantes del tejido adiposo, alterándose también los niveles del NF-KB, factor implicado en mecanismos inflamatorios [141]. Es importante destacar, que en el presente estudio se han obtenido asociaciones que implicaban a la grasa visceral y otras asociaciones en

las que el análisis estadístico indicaba que la grasa total del organismo era el predictor. La metodología aplicada y los resultados obtenidos no nos permiten discernir cuál de los dos parámetros podría ser más determinante.

Por otra parte, se encontró que el sedentarismo, determinado como el tiempo que el participante pasaba sentado, se asociaba con niveles más elevados de TNF α y con concentraciones inferiores de IL-10, siendo esta asociación independiente de los niveles de actividad física, y también de los indicadores de grasa. Estas observaciones sugieren una asociación independiente entre sedentarismo e inflamación crónica de bajo nivel. De hecho, estudios previos han demostrado una asociación similar entre sedentarismo y marcadores proinflamatorios, aunque solo en poblaciones de más edad o con riesgo de enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2 [144, 145, 147]. Sin embargo, hasta el momento, la asociación inversa entre el sedentarismo y la concentración de IL-10 no ha sido observada. Esta asociación entre sedentarismo y concentración de IL-10 se evidencia también al comparar los valores de IL-10 de los participantes distribuidos según su comportamiento sedentario. En este caso, se observa una diferencia significativa entre los niveles de IL-10 de las personas que pasan más tiempo sentadas (tercer tercil, 9-15 h diarias sentado) y los que menos (primer tercil, 1-5 h diarias sentado). En conjunto, estos resultados, novedosos en cuanto a asociación entre sedentarismo e IL-10, indicarían que el sedentarismo debe ser considerado un predictor independiente no solo sobre marcadores proinflamatorios, sino también sobre marcadores antiinflamatorios, induciendo un estado sistémico más proinflamatorio.

En general la realización de actividad física se ha asociado con un estado inflamatorio con características antiinflamatorias [108]. Sin embargo, en el presente estudio solo se observó una débil asociación positiva entre los niveles de actividad física y la concentración de IL-10. Es posible que los niveles, no demasiado elevados, de actividad física desarrollada por las personas en el estudio limitaran sus efectos, predominando los efectos de factores analizados previamente como el sedentarismo y los depósitos grasos. Es destacable que en los dos estudios incluidos en esta tesis se ha asociado la actividad física con niveles superiores de IL-10, tanto en respuesta a una sesión puntual de ejercicio como en relación con una mayor cantidad de actividad física realizada de forma habitual. De hecho, se ha sugerido que una de las posibles causas del efecto antiinflamatorio de la actividad física realizada de forma continuada es la acumulación del efecto antiinflamatorio de cada sesión puntual de ejercicio (caracterizado especialmente por incrementos puntuales de IL-10) provocando, en este sentido niveles más elevados de IL-10 en aquellos sujetos que realizan actividad física de manera habitual [108]. Un mecanismo más plausible para explicar el efecto

antiinflamatorio de la actividad física realizada de forma habitual es su efecto previniendo, o disminuyendo, la acumulación de grasa en el organismo, especialmente de grasa visceral [108]. Aun así, los resultados del presente estudio muestran un efecto independiente de la actividad física y la grasa corporal sobre la IL-10.

A diferencia del estudio observacional, en el estudio de intervención con una suplementación de cafeína se observaron efectos importantes de dicha suplementación, induciendo unos efectos antiinflamatorios significativos, caracterizados básicamente por un mayor incremento de la IL-10, pero también de IL-6, en respuesta a una sesión de ejercicio.

En consonancia con los resultados de estudios previos, observamos un aumento de IL-6 en plasma una vez finalizado el ejercicio [24, 69]. Está bien establecido que la contracción muscular es un estímulo suficiente para provocar un aumento de los niveles de ARNm de IL-6, así como de la síntesis de esta citocina, incrementándose esta producción cuando se comprometen los depósitos musculares de glucógeno [169, 179, 181-183]. En relación con la suplementación con cafeína, es destacable que el aumento de IL-6 observado después del ejercicio fue superior cuando los sujetos eran suplementados con cafeína. Este resultado está en la línea de los obtenidos en algunos estudios previos desarrollados en competiciones [24, 25] y en un ejercicio en cicloergómetro [156]. Esta mayor concentración de IL-6 en respuesta al ejercicio y la suplementación con cafeína se ha atribuido principalmente a la adrenalina [24, 156], cuyos niveles también aumentan de forma superior en las personas suplementadas con cafeína, tal como ya mostraba algún estudio previo [156]. De hecho, el análisis de regresión lineal demuestra como la adrenalina es el principal predictor del aumento de IL-6.

El hígado es el principal órgano que metaboliza la IL-6 [58], siendo sus niveles circulantes el balance entre su producción y su eliminación. El mayor aumento de adrenalina, inducido por la cafeína, tendrá efectos sobre la circulación sanguínea, que en el caso del hígado provocará un mayor descenso del flujo sanguíneo en la región esplácnica [57], lo que llevará a una disminución de la captación y metabolización de la IL-6 en este órgano, manteniendo más elevados sus niveles circulantes [57, 58, 179]. Un resultado similar se observó en un estudio previo con relación al lactato, que presentaba unos niveles superiores después de una competición completada por deportistas que habían previamente tomado un suplemento de cafeína [24]. Al seguir el lactato un metabolismo similar al de la IL-6, podría establecerse este paralelismo entre los resultados obtenidos y el mecanismo implicado para explicar la concentración más elevada de IL-6 con el ejercicio y el suplemento de cafeína.

Paralelamente, se observó un aumento de IL-10 como respuesta al ejercicio, siendo significativamente superior con la toma de cafeína, tal y como detalla la bibliografía [24, 25, 175]. No está claro cuál es el origen o el mecanismo implicado en este mayor incremento de la concentración de IL-10 en respuesta al ejercicio con la suplementación de cafeína. Por una parte, se ha atribuido a una acción directa de la IL-6, aunque se había indicado que las concentraciones de IL-6 necesarias para causarlo eran muy elevadas [125]. Aun así, el modelo de regresión señala a la IL-6 como el principal predictor de los niveles de IL-10. Sin embargo, se ha descrito que el aumento de IL-10 provocado por la IL-6 también lleva asociado una mayor concentración de IL-1ra [125], citocina cuyos valores no se diferencian entre grupos en el presente estudio. Por lo tanto, podría ser que la IL-6 contribuyera a la mayor concentración de IL-10 en respuesta al ejercicio y la cafeína, aunque son necesarios más estudios para elucidar dicha cuestión, ya que el resultado observado en la regresión lineal podría representar simplemente una coincidencia en el patrón de aparición de ambas citocinas. Por otra parte, así como la metabolización de la IL-6 depende principalmente del hígado [57], en el caso de la IL-10 es el sistema renal el principal responsable [59, 60]. En este caso, el efecto de las concentraciones superiores de adrenalina, inducidas por la cafeína, disminuyendo el flujo sanguíneo renal [61], provocaría un descenso en la metabolización y eliminación de IL-10 por parte de los riñones [59-61], lo que podría provocar como resultado los niveles superiores de IL-10 con la suplementación de cafeína. Por otra parte, no resulta probable que el mayor aumento de IL-10 se deba a una acción de las células inmunitarias, dado que debido a la tipología de los receptores A_{2a} , el antagonismo de la cafeína provocaría una disminución de los niveles de AMPc y, por lo tanto, un descenso en la producción de citocinas antiinflamatorias, como IL-10. Además, estudios previos no han demostrado ningún efecto de la cafeína sobre los niveles de AMPc o de IL-10 en PBMCs [25]. Sin embargo, no se puede descartar que, de forma general, el origen del aumento de la IL-10 en plasma después del ejercicio sea el músculo esquelético, en el que recientemente se ha detectado la expresión de IL-10, que podría estar aumentada con el ejercicio [201]. En este caso, dado que los receptores de adenosina del músculo son del tipo A_1 , la acción de la cafeína sería la de aumentar los niveles de AMPc, provocando un aumento de las citocinas antiinflamatorias [92, 220, 221], como IL-10 o que los altos niveles de epinefrina provocaran un aumento de adenilato ciclasa vía estimulación de los receptores β -2-adrenérgicos [221].

Inciendo en los mecanismos por los cuales la cafeína podría haber provocado las diferencias entre grupos, no es probable que el mecanismo mediado por la acetilcolina jugara un papel importante. Tal como se ha indicado previamente, la acetilcolina

disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias [45], efecto que no se ha observado en el presente estudio ya que las concentraciones de citocinas proinflamatorias como L-1 β , IL-8 e IFN- γ fueron similares en las personas con ambos tratamientos.

Por otra parte, el aumento de los niveles de cortisol que observamos en el caso de la suplementación con cafeína, significativo durante el período de recuperación, estaría en la misma línea de un aumento del carácter antiinflamatorio de la respuesta al ejercicio con la cafeína, dado que se ha indicado que el cortisol actúa como un potente agente antiinflamatorio [223]. Aun así, los niveles de cortisol no aumentan indistintamente del tipo de ejercicio que se realice. Parece ser que si éste es de duración corta e intensidad moderada, la liberación de cortisol no se activa, siempre y cuando los niveles de glucemia se mantengan normales [222], ya que se ha observado que la ingesta de HdC impide el aumento de cortisol en respuesta al ejercicio [156]. En cambio, en pruebas de mayor duración e intensidad elevada, sí se observan aumentos de esta hormona con el fin del mantenimiento de la homeostasia [156, 222]. Por ejemplo, 2 horas de cicloergómetro a una intensidad del 65% del VO₂máx [156] provocan un aumento significativo en los niveles de cortisol durante el periodo de recuperación en comparación con los niveles basales. En este mismo estudio [156], pese a no observarse diferencias significativas entre grupo control y suplementado con 6 mg cafeína/kg de peso, misma dosis utilizada en esta tesis, podrían indicar una similitud de tendencias tras la realización de ciclismo y de correr en un tapiz rodante durante 1 h a un 70% del VO₂máx.

La producción de IL-8 e IL-12 también podría haberse visto influenciada por la toma de cafeína, ya que la síntesis de ambas depende del AMPc. En el presente estudio, se observan aumentos de los niveles de IL-8 e IL-12 después del ejercicio, pero sin diferencias significativas entre grupos. El aumento de IL-8 parece ir ligado a la cantidad de masa muscular reclutada en un ejercicio, de esta forma, actividades como correr provocan un mayor aumento de esta citocina [152, 190], a diferencia de actividades como el ciclismo que no implica un reclutamiento muscular tan elevado [170]. El aumento de neutrófilos tras el ejercicio, podría estar influenciado en parte por la propia acción de la IL-8, catalogada como mioquina por la capacidad autocrina y paracrina que tiene al ser capaz de inducir migración de células inmunitarias hacia el músculo esquelético [210]. En nuestro caso, no observamos diferencias entre grupos en cuanto a niveles de IL-8. En el caso de IL-12, estudios previos observan un aumento tras el ejercicio [205, 280]. La IL-12 es un heterodímero (subunidades p35 y p40) con propiedades proinflamatorias [211]. La subunidad p40 de IL-12 puede actuar como citocina antiinflamatoria de manera indirecta, inhibiendo a IL-12 y dicha subunidad es

considerada el factor limitante para la expresión de IL-12, siendo producida exclusivamente por células inmunitarias (en fagocitos mononucleares activos y células dendríticas) como respuesta a un aumento de AMPc [37]. Se ha observado un aumento como consecuencia del ejercicio [205], aunque estudios previos confirman el nulo efecto de la cafeína tanto en plasma como en PBMCs [25]. En este sentido, son necesarios más estudios para determinar aspectos como el origen de los niveles superiores de IL-10 por efecto de la cafeína o, por otra parte, la falta de efectos sobre los niveles de interleucinas como la IL-8 y la IL-12.

En relación con otros efectos observados atribuibles a la cafeína, el mayor aumento de leucocitos totales tras el ejercicio y durante la recuperación con la toma de cafeína es el resultado más destacable del estudio. El patrón de aumento en función del tiempo es igual que el de los neutrófilos, los cuales, al ser la fracción mayoritaria marcan la tendencia del cambio del número de leucocitos. De hecho, encontramos diferencias significativas dependiendo de la temporalidad y la condición en el caso de los neutrófilos, como se ha comentado anteriormente, observando valores superiores con la toma de cafeína. Tanto los neutrófilos como los leucocitos totales siguen un patrón similar que consta de un aumento de sus niveles al acabar el ejercicio, el cual se mantiene elevado a las 2 h de recuperación. En el caso de los neutrófilos, el efecto denominado como neutrofilia retrasada, que constituye una elevación de los niveles de neutrófilos a las 2 h de haber finalizado el ejercicio se observa en ambos grupos. Según la bibliografía, este efecto suele normalizarse a las 24 h de haber acabado la actividad [151] y parece que la cafeína es capaz de agudizar este proceso [24, 238]. En este sentido, el número de neutrófilos aumenta de forma superior tras la actividad física con la suplementación, siendo las diferencias más marcadas durante la recuperación. El motivo de este aumento de neutrófilos post ejercicio, podría deberse a que tanto la adrenalina, como el cortisol o la IL-6 pueden participar del aumento del número de neutrófilos [24].

Cuando se analizó el efecto de la suplementación con cafeína sobre la producción de citocinas *in vitro* por parte de las células sanguíneas estimuladas con LPS no se observó ningún efecto significativo de dicha suplementación. Se ha considerado que este método supone una medida adecuada de la funcionalidad de los leucocitos [207]. Estudios previos [152, 207, 215, 216] han mostrado un efecto importante del ejercicio sobre la producción de citocinas tras la estimulación con LPS y ejercicio. Sin embargo, en nuestro caso, no se observó ningún efecto del ejercicio sobre la producción estimulada de TNF α , IL-10, IL-6 e IL-8. Estas diferencias podrían deberse a las diferentes características de los ejercicios considerados, siendo más intensos y/o prolongados en muchos de los estudios mencionados [152, 207, 215, 216]. En cualquier

caso, sí se observó un aumento de la concentración de IL-1ra a las 2 horas de haber finalizado la actividad, acorde a los resultados de Abbasi et al. [207] y Drenth et al. [215, 216]. Incluso uno de ellos, observa aumentos de esta citocina hasta 24 horas después de haber finalizado el ejercicio [207]. Por otra parte, no se observó ningún efecto de la suplementación con cafeína, lo que podría estar de acuerdo con estudios previos que no remarcaron ningún efecto de la suplementación con cafeína sobre la concentración de citocinas en PBMCs en respuesta al ejercicio [25].

Capítulo 6: LIMITACIONES DE LA TESIS

La tesis descrita presenta ciertas limitaciones que deben ser comentadas. En cuanto al primer estudio presentado, éste se limitó a datos transversales de población universitaria. El carácter observacional del estudio supone una limitación. Sin embargo, aunque solo se consideró población universitaria, tal como se ha indicado previamente, podría ser una población representativa de muchas ocupaciones laborales que implican un grado de sedentarismo elevado.

En ambos estudios se han recogido diferentes variables de forma auto-reportada, siendo especialmente significativo el caso del estudio observacional, en el que las variables principales de estudio como la ingesta de cafeína, los niveles de actividad física o el sedentarismo fueron medidos de forma auto-reportada. Sin embargo, en relación con los niveles de actividad física cabe mencionar que se usó el cuestionario IPAQ, un cuestionario validado y ampliamente usado en estudios previos. Este mismo cuestionario fue el que se utilizó para determinar el sedentarismo, simplemente con la pregunta que incluye dicho cuestionario con relación a cuántas horas sentado pasa la persona que lo responde. Además, no se recogieron el número, la duración y la frecuencia de las “pausas activas” dentro, o entre, periodos de actividad sedentaria. En este sentido, estas “pausas activas”, que podrían ser definidas como breves periodos de actividad no sedentaria que rompen la continuidad del comportamiento sedentario, podrían modificar algunas asociaciones entre sedentarismo y marcadores inflamatorios [145], al menos cuando el tiempo de comportamiento sedentario no es, en conjunto, demasiado prolongado [144]. Además, los métodos usados para determinar el porcentaje de masa grasa y grasa visceral, especialmente esta última, presentan algunas limitaciones en comparación con el método “Gold estándar” como sería la densitometría [281].

Una importante limitación del estudio de intervención fue que solo se consideró la participación de varones jóvenes, y hubiera sido interesante analizar los efectos de la suplementación con cafeína en mujeres y población de mayor edad. En el caso de las mujeres, no se incluyeron en el estudio ya que es sabido que el estado hormonal influye sobre la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, para obtener información completa debería haberse hecho el estudio considerando las variaciones de los niveles hormonales. Considerando los recursos disponibles, este abordaje era inviable, además de no ser un objetivo del proyecto. También hubiera sido interesante determinar si los efectos de la cafeína observados en el presente estudio se mantienen en otros tipos de pruebas de diferente duración y/o intensidad, sobre todo en aquellas que implican una mayor

demanda energética. En cualquier caso, son necesarios más estudios para determinar las fuentes que implican el incremento de las citocinas después del ejercicio, principalmente el origen de los elevados niveles de IL-10 en los sujetos del grupo suplementado. En este sentido, serían necesarias determinaciones adicionales importantes como analizar las concentraciones de IL-10, o sus niveles de ARNm, y AMPc en el tejido muscular activo.

Capítulo 7: CONCLUSIONES

- I. Tanto la actividad física desarrollada de forma continua como una sesión puntual de actividad física inducen un aumento de la concentración plasmática de IL-10, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio de la actividad física.
- II. La ingesta habitual de cafeína se asoció con un ligero efecto antiinflamatorio, caracterizado por concentraciones inferiores de PCR. Sin embargo, este efecto se ha atribuido a otros componentes del café como son los ácidos clorogénicos. No se observaron otras asociaciones entre la ingesta de cafeína y marcadores de inflamación, lo que podría atribuirse a una ingesta insuficiente de cafeína para provocar estos efectos.
- III. El mayor acúmulo de grasa se asoció con un mayor estado proinflamatorio, caracterizado por concentraciones más elevadas de PCR, IL-6 y TNF α , y concentraciones inferiores de IL-10 y adiponectina, siendo, probablemente, el acúmulo de grasa, total o visceral, el predictor más importante de este estado proinflamatorio. Dentro de esta observación, es importante destacar que los niveles de adiponectina eran superiores en mujeres, aun teniendo mayores niveles de grasa corporal. Es destacable que estas asociaciones entre adiposidad e indicadores de un estado más proinflamatorio se encontraron en una población que, como promedio, se encontraba dentro del normopeso.
- IV. El sedentarismo se reveló como un importante predictor del estado proinflamatorio, caracterizado por concentraciones inferiores de IL-10 y concentraciones superiores de TNF α en aquellas personas con un mayor comportamiento sedentario. Es destacable que el sedentarismo fue encontrado como un predictor independiente de la actividad física o del acúmulo de grasa.
- V. La suplementación con cafeína previa a una sesión de ejercicio no extenuante indujo una respuesta inflamatoria al ejercicio con un carácter más antiinflamatorio, caracterizada por mayores aumentos de IL-10 e IL-6.
- VI. El mayor incremento de IL-6 podría atribuirse a las concentraciones superiores de adrenalina inducidas por la cafeína, que disminuyen el flujo sanguíneo esplácnico, reduciendo la captación y metabolismo de la IL-6 por parte del hígado. Sin embargo, aunque el mayor incremento de IL-6 podría ser uno de los factores implicados, no se conoce el mecanismo que induce la mayor concentración de IL-10.

- VII. La suplementación con cafeína provocó un mayor aumento del número de neutrófilos circulantes en respuesta al ejercicio y durante la posterior recuperación. Este mayor aumento podría estar mediado por las concentraciones superiores de adrenalina, cortisol o IL-6 inducidas por la cafeína. Sin embargo, la suplementación con cafeína no modificó la producción estimulada de citocinas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. McKim, E.M. and W.A. McKim, *Caffeine: how much is too much?* Can Nurse, 1993. **89**(11): p. 19-22.
2. Shabir, A., et al., *The Influence of Caffeine Expectancies on Sport, Exercise, and Cognitive Performance*. Nutrients, 2018. **10**(10).
3. Burke, L.M., *Caffeine and sports performance*. Appl Physiol Nutr Metab, 2008. **33**(6): p. 1319-34.
4. Fulgoni, V.L., D.R. Keast, and H.R. Lieberman, *Trends in intake and sources of caffeine in the diets of US adults: 2001-2010*. Am J Clin Nutr, 2015. **101**(5): p. 1081-7.
5. Joseph G. Lisko, G.E.L., J. Brett Kimbrell, Michael E. Rybak, Liza Valentin-Blasini, and Clifford H. Watson, *Caffeine Concentrations in Coffee, Tea, Chocolate, and Energy Drink Flavored E-liquids*. Nicotine Tob Res, 2017. **19**(4): p. 484-492.
6. Sousa, A.G. and T.H. da Costa, *Usual coffee intake in Brazil: results from the National Dietary Survey 2008-9*. Br J Nutr, 2015. **113**(10): p. 1615-20.
7. (EFSA), E.F.S.A., *Scientific opinion on the safety of caffeine*. EFSA Journal, 2015. **13**(5).
8. McLellan, T.M., J.A. Caldwell, and H.R. Lieberman, *A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance*. Neurosci Biobehav Rev, 2016. **71**: p. 294-312.
9. Reyes, C.M. and M.C. Cornelis, *Caffeine in the Diet: Country-Level Consumption and Guidelines*. Nutrients, 2018. **10**(11).
10. Turnbull, D., et al., *Caffeine and cardiovascular health*. Regul Toxicol Pharmacol, 2017. **89**: p. 165-185.
11. Prasanth, M.I., et al., *A Review of the Role of Green Tea* (Nutrients, 2019. **11**(2).
12. Dufresne, C.J. and E.R. Farnworth, *A review of latest research findings on the health promotion properties of tea*. J Nutr Biochem, 2001. **12**(7): p. 404-421.
13. Larrañaga, et al., *Encuesta de nutrición 2005. Hábitos alimentarios y estado de salud de la población vasca de 4 a 18 años.* . Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, DL. , 2006.
14. Serra-Majem and G.-C.R. L, Ribas L, Pérez-Rodrigo C and Aranceta J, *Food patterns of Spanish schoolchildren and adolescents: The enKid Study*. Public Health Nutr, 2001. **4**: p. 1433-1438.
15. Ruiz, L.D. and R.E. Scherr, *Risk of Energy Drink Consumption to Adolescent Health*. Am J Lifestyle Med, 2019. **13**(1): p. 22-25.
16. Akash, M.S., K. Rehman, and S. Chen, *Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus*. Nutrition, 2014. **30**(7-8): p. 755-63.
17. Ding, M., et al., *Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis*. Diabetes Care, 2014. **37**(2): p. 569-86.
18. Shang, F., X. Li, and X. Jiang, *Coffee consumption and risk of the metabolic syndrome: A meta-analysis*. Diabetes Metab, 2016. **42**(2): p. 80-7.
19. Sengpiel, V., et al., *Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with birth weight but not with gestational length: results from a large prospective observational cohort study*. BMC Med, 2013. **11**: p. 42.
20. Group, C.S., *Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study*. BMJ, 2008. **337**: p. a2332.

21. James, J.E., *Maternal caffeine consumption and pregnancy outcomes: a narrative review with implications for advice to mothers and mothers-to-be*. BMJ Evid Based Med, 2020.
22. Wikoff, D., et al., *Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children*. Food Chem Toxicol, 2017. **109**(Pt 1): p. 585-648.
23. O'Callaghan, F., O. Muurlink, and N. Reid, *Effects of caffeine on sleep quality and daytime functioning*. Risk Manag Healthc Policy, 2018. **11**: p. 263-271.
24. Tauler, P., et al., *Effects of caffeine on the inflammatory response induced by a 15-km run competition*. Med Sci Sports Exerc, 2013. **45**(7): p. 1269-76.
25. Tauler, P., et al., *Effects of Caffeine Supplementation on Plasma and Blood Mononuclear Cell Interleukin-10 Levels After Exercise*. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2016. **26**(1): p. 8-16.
26. Spriet, L.L., *Exercise and sport performance with low doses of caffeine*. Sports Med, 2014. **44 Suppl 2**: p. S175-84.
27. Fredholm, B.B., et al., *Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(1): p. 83-133.
28. Horrigan, L. *Caffeine inhibits monocyte and neutrophil chemotaxis at concentrations relevant to normal human consumption*. in *Proceedings of the International Cytokine Society Annual Meeting*. 2003. Trinity College Dublin, Ireland.
29. Lelo, A., et al., *Assessment of caffeine exposure: caffeine content of beverages, caffeine intake, and plasma concentrations of methylxanthines*. Clin Pharmacol Ther, 1986. **39**(1): p. 54-9.
30. de Leon, J., et al., *A pilot study of plasma caffeine concentrations in a US sample of smoker and nonsmoker volunteers*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003. **27**(1): p. 165-71.
31. Southward, K., et al., *The Role of Genetics in Moderating the Inter-Individual Differences in the Ergogenicity of Caffeine*. Nutrients, 2018. **10**(10).
32. Rybak, M.E., et al., *Urine excretion of caffeine and select caffeine metabolites is common in the U.S. population and associated with caffeine intake*. J Nutr, 2015. **145**(4): p. 766-74.
33. Petrovic, D., et al., *Relation of 24-hour urinary caffeine and caffeine metabolite excretions with self-reported consumption of coffee and other caffeinated beverages in the general population*. Nutr Metab (Lond), 2016. **13**: p. 81.
34. Pickering, C. and J. Grgic, *Caffeine and Exercise: What Next?* Sports Med, 2019. **49**(7): p. 1007-1030.
35. Cornelis, M.C., A. El-Sohemy, and H. Campos, *Genetic polymorphism of the adenosine A2A receptor is associated with habitual caffeine consumption*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(1): p. 240-4.
36. Sawynok, J., *Adenosine receptor targets for pain*. Neuroscience, 2016. **338**: p. 1-18.
37. Haskó, G. and B.N. Cronstein, *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 33-9.
38. Csóka, B. and G. Haskó, *Adenosine, inflammation pathways and therapeutic challenges*. Joint Bone Spine, 2011. **78**(1): p. 4-6.
39. Schulte, G. and B.B. Fredholm, *Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases*. Cell Signal, 2003. **15**(9): p. 813-27.
40. Sheth, S., et al., *Adenosine receptors: expression, function and regulation*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(2): p. 2024-52.

41. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update*. *Pharmacol Rev*, 2011. **63**(1): p. 1-34.
42. Cappelletti, S., et al., *Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug?* *Curr Neuropharmacol*, 2015. **13**(1): p. 71-88.
43. Steck, R.P., et al., *Pharmacologic immunosuppression of mononuclear phagocyte phagocytosis by caffeine*. *Pharmacol Res Perspect*, 2015. **3**(6): p. e00180.
44. Mandel, H.G., *Update on caffeine consumption, disposition and action*. *Food Chem Toxicol*, 2002. **40**(9): p. 1231-4.
45. Pohanka, M.a.D., P, *Caffeine Inhibits Acetylcholinesterase, But Not Butyrylcholinesterase*. *International Journal of Molecular Science*, 2013(14): p. 9873-9882.
46. Nehlig, A., ed. *Coffee, Tea, Chocolate and the Brain*. ed. C. Prasad. 2004: Strasburg, France.
47. Endo, M., *Calcium release from the sarcoplasmic reticulum*. *Physiol Rev*, 1977. **57**(1): p. 71-108.
48. Kalmar, J.M. and E. Cafarelli, *Caffeine: a valuable tool to study central fatigue in humans?* *Exerc Sport Sci Rev*, 2004. **32**(4): p. 143-7.
49. Cairns, S.P. and F. Borrani, *β -Adrenergic modulation of skeletal muscle contraction: key role of excitation-contraction coupling*. *J Physiol*, 2015. **593**(21): p. 4713-27.
50. Thong, F.S. and T.E. Graham, *Caffeine-induced impairment of glucose tolerance is abolished by beta-adrenergic receptor blockade in humans*. *J Appl Physiol* (1985), 2002. **92**(6): p. 2347-52.
51. Lovallo, W.R., et al., *Stress-like adrenocorticotropin responses to caffeine in young healthy men*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996. **55**(3): p. 365-9.
52. Lee, J.B., et al., *Blood dopamine level enhanced by caffeine in men after treadmill running*. *Chin J Physiol*, 2019. **62**(6): p. 279-284.
53. Lee, J.B. and T.W. Kim, *Ingestion of caffeine links dopamine and 5-hydroxytryptamine release during half immersion in 42°C hot water in a humans*. *J Exerc Rehabil*, 2019. **15**(4): p. 571-575.
54. Lim, B.V., et al., *Caffeine inhibits exercise-induced increase in tryptophan hydroxylase expression in dorsal and median raphe of Sprague-Dawley rats*. *Neurosci Lett*, 2001. **308**(1): p. 25-8.
55. Souza, D.B., et al., *Acute effects of caffeine-containing energy drinks on physical performance: a systematic review and meta-analysis*. *Eur J Nutr*, 2017. **56**(1): p. 13-27.
56. Nurminen, M.L., et al., *Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review*. *Eur J Clin Nutr*, 1999. **53**(11): p. 831-9.
57. Takala, J., *Determinants of splanchnic blood flow*. *Br J Anaesth*, 1996. **77**(1): p. 50-8.
58. Febbraio, M.A., et al., *Hepatosplanchnic clearance of interleukin-6 in humans during exercise*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **285**(2): p. E397-402.
59. Huhn, R.D., et al., *Pharmacokinetics and immunomodulatory properties of intravenously administered recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers*. *Blood*, 1996. **87**(2): p. 699-705.
60. Yilmaz, M.I., et al., *The relationship between IL-10 levels and cardiovascular events in patients with CKD*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014. **9**(7): p. 1207-16.
61. *Physiologic Control of Glomerular Filtration and Renal Blood Flow [internet]*. Available from: https://www.brainkart.com/article/Physiologic-Control-of-Glomerular-Filtration-and-Renal-Blood-Flow_19402/ [cited 2020 Mar 21].

62. Daniels, J.W., et al., *Effects of caffeine on blood pressure, heart rate, and forearm blood flow during dynamic leg exercise*. J Appl Physiol (1985), 1998. **85**(1): p. 154-9.
63. Addicott, M.A., et al., *The effect of daily caffeine use on cerebral blood flow: How much caffeine can we tolerate?* Hum Brain Mapp, 2009. **30**(10): p. 3102-14.
64. Davis, J.M., et al., *Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **284**(2): p. R399-404.
65. Lieberman, H.R., *Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training Sea-Air-Land*. Psychopharmacology, 2002. **164**: p. 250-261.
66. Huntley, J., *Caffeine Expectancy Questionnaire (CaffEQ): Construction, psychometric properties, and associations with caffeine use, caffeine dependence, and other related variables*. Psychol. Assess, 2012. **24**: p. 592-607.
67. Astorino, T.A., et al., *Effect of caffeine intake on pain perception during high-intensity exercise*. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2011. **21**(1): p. 27-32.
68. Graham, T.E., *Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance*. Sports Med, 2001. **31**(11): p. 785-807.
69. Salicio, V.M.M., et al., *The effect of caffeine supplementation on trained individuals subjected to maximal treadmill test*. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2017. **14**(1): p. 16-23.
70. Kim, J. and J. Lee, *A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I*. J Exerc Rehabil, 2014. **10**(6): p. 349-56.
71. Chen, H.Y., et al., *Effects of caffeine and sex on muscle performance and delayed-onset muscle soreness after exercise-induced muscle damage: a double-blind randomized trial*. J Appl Physiol (1985), 2019. **127**(3): p. 798-805.
72. Kim, J., J. Park, and K. Lim, *Nutrition Supplements to Stimulate Lipolysis: A Review in Relation to Endurance Exercise Capacity*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2016. **62**(3): p. 141-61.
73. Womack, C.J., et al., *The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine*. J Int Soc Sports Nutr, 2012. **9**(1): p. 7.
74. Womack, C.J., et al., *Erratum to: The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine*. J Int Soc Sports Nutr, 2015. **12**: p. 24.
75. Guest, N., et al., *Caffeine, CYP1A2 Genotype, and Endurance Performance in Athletes*. Med Sci Sports Exerc, 2018. **50**(8): p. 1570-1578.
76. Loy, B.D., *Caffeine is ergogenic for Adenosine A2A Receptor Gene (ADORA2A) T Allele Homozygotes: A Pilot Study*. Journal of Caffeine Research, 2015. **5**(2).
77. Grgic, J., et al., *ADORA2A C Allele Carriers Exhibit Ergogenic Responses to Caffeine Supplementation*. Nutrients, 2020. **12**(3).
78. Graham, T.E. and L.L. Spriet, *Performance and metabolic responses to a high caffeine dose during prolonged exercise*. J Appl Physiol (1985), 1991. **71**(6): p. 2292-8.
79. Hodgson, A.B., R.K. Randell, and A.E. Jeukendrup, *The metabolic and performance effects of caffeine compared to coffee during endurance exercise*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e59561.
80. Costill, D.L., G.P. Dalsky, and W.J. Fink, *Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance*. Med Sci Sports, 1978. **10**(3): p. 155-8.
81. Doherty, M. and P.M. Smith, *Effects of caffeine ingestion on rating of perceived exertion during and after exercise: a meta-analysis*. Scand J Med Sci Sports, 2005. **15**(2): p. 69-78.

82. Grgic, J., et al., *Effects of caffeine intake on muscle strength and power: a systematic review and meta-analysis*. J Int Soc Sports Nutr, 2018. **15**: p. 11.
83. Duncan, M.J., M. Lyons, and J. Hankey, *Placebo effects of caffeine on short-term resistance exercise to failure*. Int J Sports Physiol Perform, 2009. **4**(2): p. 244-53.
84. Wiles, J.D., et al., *The effects of caffeine ingestion on performance time, speed and power during a laboratory-based 1 km cycling time-trial*. J Sports Sci, 2006. **24**(11): p. 1165-71.
85. Del Coso, J., et al., *Dose response effects of a caffeine-containing energy drink on muscle performance: a repeated measures design*. J Int Soc Sports Nutr, 2012. **9**(1): p. 21.
86. Del Coso, J., et al., *Effects of a caffeine-containing energy drink on simulated soccer performance*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31380.
87. Bloms, L.P., et al., *The Effects of Caffeine on Vertical Jump Height and Execution in Collegiate Athletes*. J Strength Cond Res, 2016. **30**(7): p. 1855-61.
88. Trexler, E.T., et al., *Effects of coffee and caffeine anhydrous on strength and sprint performance*. Eur J Sport Sci, 2016. **16**(6): p. 702-10.
89. Goods, P.S., G. Landers, and S. Fulton, *Caffeine Ingestion Improves Repeated Freestyle Sprints in Elite Male Swimmers*. J Sports Sci Med, 2017. **16**(1): p. 93-98.
90. Harpaz, E., et al., *The effect of caffeine on energy balance*. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2017. **28**(1): p. 1-10.
91. Guest, N.S., et al., *International society of sports nutrition position stand: caffeine and exercise performance*. J Int Soc Sports Nutr, 2021. **18**(1): p. 1.
92. Graham, T.E., et al., *Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise?* Appl Physiol Nutr Metab, 2008. **33**(6): p. 1311-8.
93. Collado-Mateo, D., et al., *Effect of Acute Caffeine Intake on the Fat Oxidation Rate during Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Nutrients, 2020. **12**(12).
94. Glaister, M., et al., *The Effects of Caffeine Supplementation on Physiological Responses to Submaximal Exercise in Endurance-Trained Men*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161375.
95. Lopes-Silva, J.P., et al., *Caffeine ingestion after rapid weight loss in judo athletes reduces perceived effort and increases plasma lactate concentration without improving performance*. Nutrients, 2014. **6**(7): p. 2931-45.
96. Horrigan, L.A., J.P. Kelly, and T.J. Connor, *Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(10-11): p. 1409-17.
97. Hamann, J.J., K.M. Kelley, and L.B. Gladden, *Effect of epinephrine on net lactate uptake by contracting skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(6): p. 2635-41.
98. Mora-Rodríguez, R., et al., *Caffeine ingestion reverses the circadian rhythm effects on neuromuscular performance in highly resistance-trained men*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e33807.
99. Malek, M.H., et al., *Effects of eight weeks of caffeine supplementation and endurance training on aerobic fitness and body composition*. J Strength Cond Res, 2006. **20**(4): p. 751-5.
100. Lara, B., et al., *Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine*. PLoS One, 2019. **14**(1): p. e0210275.
101. Fritsche, K.L., *The science of fatty acids and inflammation*. Adv Nutr, 2015. **6**(3): p. 293S-301S.
102. Petersen, A.M. and B.K. Pedersen, *The anti-inflammatory effect of exercise*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(4): p. 1154-62.

103. Knuiiman, P., et al., *Plasma cytokine responses to resistance exercise with different nutrient availability on a concurrent exercise day in trained healthy males*. *Physiol Rep*, 2018. **6**(11): p. e13708.
104. Sproston, N., *Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection*. *Frontiers in Immunology*, 2018. **9**.
105. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(2): p. 85-97.
106. Kern, P.A., et al., *Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression*. *Diabetes*, 2003. **52**(7): p. 1779-85.
107. Garaulet, M., et al., *Adiponectin, the controversial hormone*. *Public Health Nutr*, 2007. **10**(10A): p. 1145-50.
108. Gleeson, M., et al., *The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(9): p. 607-15.
109. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
110. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(4): p. 1379-406.
111. Kristiansen, O.P. and T. Mandrup-Poulsen, *Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?* *Diabetes*, 2005. **54 Suppl 2**: p. S114-24.
112. Volpato, S., et al., *Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study*. *Circulation*, 2001. **103**(7): p. 947-53.
113. Bruunsgaard, H., et al., *Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **132**(1): p. 24-31.
114. Coppack, S.W., *Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue*. *Proc Nutr Soc*, 2001. **60**(3): p. 349-56.
115. Peraldi, P., et al., *Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(22): p. 13018-22.
116. Hotamisligil, G.S., *Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1999. **107**(2): p. 119-25.
117. Souza, S.C., et al., *Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(38): p. 24665-9.
118. Gasic, S., B. Tian, and A. Green, *Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(10): p. 6770-5.
119. Botton, L.M., et al., *Inhibition of proteasome activity blocks the ability of TNF alpha to down-regulate G(i) proteins and stimulate lipolysis*. *Endocrinology*, 2001. **142**(12): p. 5069-75.
120. Bruce, C.R. and D.J. Dyck, *Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **287**(4): p. E616-21.
121. Zatterale, F., et al., *Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes*. *Front Physiol*, 2019. **10**: p. 1607.

122. Kern, L., et al., *Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation-Driven Liver and Colorectal Cancers*. *Cancers (Basel)*, 2018. **11**(1).
123. Longo, M., et al., *Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(9).
124. Palmer, A.K. and J.L. Kirkland, *Aging and adipose tissue: potential interventions for diabetes and regenerative medicine*. *Exp Gerontol*, 2016. **86**: p. 97-105.
125. Steensberg, A., et al., *IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **285**(2): p. E433-7.
126. Taaffe, D.R., et al., *Cross-sectional and prospective relationships of interleukin-6 and C-reactive protein with physical performance in elderly persons: MacArthur studies of successful aging*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2000. **55**(12): p. M709-15.
127. Smith, J.K., et al., *Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease*. *JAMA*, 1999. **281**(18): p. 1722-7.
128. Cohen, H.J., et al., *The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1997. **52**(4): p. M201-8.
129. Pedersen, B.K., *Health Benefits Related to Chronic Low-Grade Exercise in Patients With Systemic Inflammation*. 2007. **1**: p. 289-298.
130. Lehnig, A.C. and K.I. Stanford, *Exercise-induced adaptations to white and brown adipose tissue*. *J Exp Biol*, 2018. **221**(Pt Suppl 1).
131. Kasapis, C. and P.D. Thompson, *The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(10): p. 1563-9.
132. Sanders, A.E., et al., *Physical activity, inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid and periodontitis*. *J Clin Periodontol*, 2009. **36**(5): p. 388-95.
133. Kelley, G.A. and K.S. Kelley, *Effects of aerobic exercise on C-reactive protein, body composition, and maximum oxygen consumption in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *Metabolism*, 2006. **55**(11): p. 1500-7.
134. Kohut, M.L., et al., *Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults*. *Brain Behav Immun*, 2006. **20**(3): p. 201-9.
135. Mattusch, F., et al., *Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training*. *Int J Sports Med*, 2000. **21**(1): p. 21-4.
136. Abd El-Kader, S.M. and F.M. Al-Shreef, *Inflammatory cytokines and immune system modulation by aerobic versus resisted exercise training for elderly*. *Afr Health Sci*, 2018. **18**(1): p. 120-131.
137. Beavers, K.M., T.E. Brinkley, and B.J. Nicklas, *Effect of exercise training on chronic inflammation*. *Clin Chim Acta*, 2010. **411**(11-12): p. 785-93.
138. Abramson, J.L. and V. Vaccarino, *Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults*. *Arch Intern Med*, 2002. **162**(11): p. 1286-92.
139. Conroy, S.M., et al., *Impact of aerobic exercise on levels of IL-4 and IL-10: results from two randomized intervention trials*. *Cancer Med*, 2016. **5**(9): p. 2385-97.
140. Kovats, S., *Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways*. *Cell Immunol*, 2015. **294**(2): p. 63-9.
141. Janochova, K., M. Haluzik, and M. Buzga, *Visceral fat and insulin resistance - what we know?* *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2019. **163**(1): p. 19-27.

142. Markovitch, D., R.M. Tyrrell, and D. Thompson, *Acute moderate-intensity exercise in middle-aged men has neither an anti- nor proinflammatory effect*. J Appl Physiol (1985), 2008. **105**(1): p. 260-5.
143. Bull, F.C., et al., *World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour*. Br J Sports Med, 2020. **54**(24): p. 1451-1462.
144. Henson, J., et al., *Sedentary time and markers of chronic low-grade inflammation in a high risk population*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78350.
145. Healy, G.N., et al., *Sedentary time and cardio-metabolic biomarkers in US adults: NHANES 2003-06*. Eur Heart J, 2011. **32**(5): p. 590-7.
146. Allison, M.A., et al., *Sedentary behavior and adiposity-associated inflammation: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. Am J Prev Med, 2012. **42**(1): p. 8-13.
147. Owen, N., et al., *Too much sitting: the population health science of sedentary behavior*. Exerc Sport Sci Rev, 2010. **38**(3): p. 105-13.
148. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
149. Gleeson, M. and C. Williams, *Intense exercise training and immune function*. Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 2013. **76**: p. 39-50.
150. Kakanis, M.W., et al., *The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes*. Exerc Immunol Rev, 2010. **16**: p. 119-37.
151. Peake, J.M., et al., *Recovery of the immune system after exercise*. J Appl Physiol (1985), 2017. **122**(5): p. 1077-1087.
152. Nielsen, H.G., et al., *Plasma Cytokine Profiles in Long-Term Strenuous Exercise*. J Sports Med (Hindawi Publ Corp), 2016. **2016**: p. 7186137.
153. Santos, V.C., et al., *Marathon Race Affects Neutrophil Surface Molecules: Role of Inflammatory Mediators*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0166687.
154. Pedersen, B.K. and L. Hoffman-Goetz, *Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation*. Physiol Rev, 2000. **80**(3): p. 1055-81.
155. Walker, G.J., et al., *The effect of caffeine ingestion on human neutrophil oxidative burst responses following time-trial cycling*. J Sports Sci, 2008. **26**(6): p. 611-9.
156. Walker, G.J., et al., *Immunoendocrine response to cycling following ingestion of caffeine and carbohydrate*. Med Sci Sports Exerc, 2007. **39**(9): p. 1554-60.
157. Walker, G.J., et al., *The effect of caffeine ingestion on neutrophil oxidative burst responses following prolonged cycling*. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2006. **16**(1): p. 24-35.
158. Yamada, M., et al., *Raised plasma G-CSF and IL-6 after exercise may play a role in neutrophil mobilization into the circulation*. J Appl Physiol, 2002. **92**(5): p. 1789-94.
159. Mooren, F.C., et al., *Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise*. J Appl Physiol (1985), 2002. **93**(1): p. 147-53.
160. Simpson, R.J., et al., *Apoptosis does not contribute to the blood lymphocytopenia observed after intensive and downhill treadmill running in humans*. Res Sports Med, 2007. **15**(3): p. 157-74.
161. Krüger, K., et al., *Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways*. J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(5): p. 1226-32.
162. Neubauer, O., et al., *Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses?* Exerc Immunol Rev, 2008. **14**: p. 51-72.
163. Reichhold, S., et al., *DNA damage in response to an Ironman triathlon*. Free Radic Res, 2009. **43**(8): p. 753-60.

164. Lancaster, G.I., et al., *Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes*. *Exerc Immunol Rev*, 2004. **10**: p. 91-106.
165. Rehman, J., et al., *Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(12): p. 2314-8.
166. Tibdall, J., *Mechanisms of muscle injury, repair and regeneration*. *Compr. Physiol*, 2011. **1**(4): p. 2029-62.
167. Chazaud, B., *Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration*. *Immunobiology*, 2014. **219**(3): p. 172-8.
168. Walsh, N.P., et al., *Position statement. Part one: Immune function and exercise*. *Exerc Immunol Rev*, 2011. **17**: p. 6-63.
169. Ostrowski, K., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans*. *J Physiol*, 1999. **515 (Pt 1)**: p. 287-91.
170. Chan, M.H., et al., *Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **287**(2): p. R322-7.
171. Pedersen, B., *Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects*. *Pflugers Arch*, 2003. **446**(1): p. 9-16.
172. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 683-765.
173. Wilund, K.R., *Is the anti-inflammatory effect of regular exercise responsible for reduced cardiovascular disease?* *Clin Sci (Lond)*, 2007. **112**(11): p. 543-55.
174. Febbraio, M.A. and B.K. Pedersen, *Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles*. *FASEB J*, 2002. **16**(11): p. 1335-47.
175. Zaldivar, F., et al., *Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes*. *J Appl Physiol (1985)*, 2006. **100**(4): p. 1124-33.
176. Zwetsloot, K.A., et al., *High-intensity interval training induces a modest systemic inflammatory response in active, young men*. *J Inflamm Res*, 2014. **7**: p. 9-17.
177. Cabral-Santos, C., et al., *Similar Anti-Inflammatory Acute Responses from Moderate-Intensity Continuous and High-Intensity Intermittent Exercise*. *J Sports Sci Med*, 2015. **14**(4): p. 849-56.
178. Kishimoto, T., *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8 Suppl 2**: p. S2.
179. Steensberg, A., et al., *Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6*. *J Physiol*, 2000. **529 Pt 1**: p. 237-42.
180. Ostrowski, K., et al., *Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running*. *J Physiol*, 1998. **508 (Pt 3)**: p. 949-53.
181. Febbraio, M.A., et al., *Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans*. *J Physiol*, 2003. **549**(Pt 2): p. 607-12.
182. Jonsdottir, I.H., et al., *Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles*. *J Physiol*, 2000. **528 Pt 1**: p. 157-63.
183. Steensberg, A., et al., *Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content*. *J Physiol*, 2001. **537**(Pt 2): p. 633-9.
184. Fischer, C.P., *Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?* *Exerc Immunol Rev*, 2006. **12**: p. 6-33.
185. Cadaret, C.N., et al., *Acute exposure of primary rat soleus muscle to zilpaterol HCl (β2 adrenergic agonist), TNFα, or IL-6 in culture increases glucose oxidation rates*

- independent of the impact on insulin signaling or glucose uptake.* Cytokine, 2017. **96**: p. 107-113.
186. Glund, S., et al., *Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle.* Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1630-7.
 187. Verbickas, V., et al., *Effect of sprint cycling and stretch-shortening cycle exercises on the neuromuscular, immune and stress indicators in young men.* J Physiol Pharmacol, 2017. **68**(1): p. 125-132.
 188. Nieman, D.C., et al., *Immune response to a 30-minute walk.* Med Sci Sports Exerc, 2005. **37**(1): p. 57-62.
 189. Keller, C., et al., *Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content.* FASEB J, 2001. **15**(14): p. 2748-50.
 190. Nieman, D.C., et al., *Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run.* J Appl Physiol (1985), 2003. **94**(5): p. 1917-25.
 191. Starkie, R.L., et al., *Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 mRNA, during exercise in humans.* J Physiol, 2001. **533**(Pt 2): p. 585-91.
 192. Nybo, L., *Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise.* Journal of Physiology, 2002. **542**(3): p. 991-995.
 193. Secher, N., *Cerebral blood flow and metabolism during exercise: implications for fatigue.* J Appl Physiol, 2008. **104**: p. 306-314.
 194. Stouthard, J.M., R.P. Oude Elferink, and H.P. Sauerwein, *Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **220**(2): p. 241-5.
 195. Townsend, L.K., C.M. Knuth, and D.C. Wright, *Cycling our way to fit fat.* Physiol Rep, 2017. **5**(7).
 196. Nonogaki, K., et al., *Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats.* Endocrinology, 1995. **136**(5): p. 2143-9.
 197. Kłapcińska, B., et al., *Metabolic responses to a 48-h ultra-marathon run in middle-aged male amateur runners.* Eur J Appl Physiol, 2013. **113**(11): p. 2781-93.
 198. Maynard, C.L. and C.T. Weaver, *Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation.* Immunol Rev, 2008. **226**: p. 219-33.
 199. Wang, P., et al., *Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms.* J Biol Chem, 1995. **270**(16): p. 9558-63.
 200. Rong, Y.D., et al., *Study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory cytokine IL-6, anti-inflammatory cytokine IL-10.* BMC Geriatr, 2018. **18**(1): p. 308.
 201. Della Gatta, P.A., et al., *Effect of exercise training on skeletal muscle cytokine expression in the elderly.* Brain Behav Immun, 2014. **39**: p. 80-6.
 202. Aguiló, A., et al., *Vitamin C supplementation does not influence plasma and blood mononuclear cell IL-6 and IL-10 levels after exercise.* J Sports Sci, 2014. **32**(17): p. 1659-69.
 203. Peake, J.M., et al., *Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects.* Exerc Immunol Rev, 2015. **21**: p. 8-25.
 204. Cerqueira, É., et al., *Inflammatory Effects of High and Moderate Intensity Exercise-A Systematic Review.* Front Physiol, 2019. **10**: p. 1550.
 205. Peake, J.M., et al., *Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage.* Eur J Appl Physiol, 2005. **95**(5-6): p. 514-21.

206. Lira, F.S., et al., *Differences in metabolic and inflammatory responses in lower and upper body high-intensity intermittent exercise*. Eur J Appl Physiol, 2015. **115**(7): p. 1467-74.
207. Abbasi, A., et al., *Changes in spontaneous and LPS-induced ex vivo cytokine production and mRNA expression in male and female athletes following prolonged exhaustive exercise*. Exerc Immunol Rev, 2013. **19**: p. 8-28.
208. Ostrowski, K., et al., *Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans*. Eur J Appl Physiol, 2001. **84**(3): p. 244-5.
209. Akerstrom, T., et al., *Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle*. J Physiol, 2005. **563**(Pt 2): p. 507-16.
210. Baggiolini, M., *Chemokines in pathology and medicine*. J Intern Med, 2001. **250**(2): p. 91-104.
211. Elenkov, I.J., G.P. Chrousos, and R.L. Wilder, *Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **917**: p. 94-105.
212. Yan, J., M.J. Smyth, and M.W.L. Teng, *Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(7).
213. Zamani, A., I. Salehi, and M. Alahgholi-Hajibehzad, *Moderate Exercise Enhances the Production of Interferon-gamma and Interleukin-12 in Peripheral Blood Mononuclear Cells*. Immune Netw, 2017. **17**(3): p. 186-191.
214. Rietschel, E.T., et al., *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. FASEB J, 1994. **8**(2): p. 217-25.
215. Drenth, J.P., et al., *Increased circulating cytokine receptors and ex vivo interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production but decreased tumour necrosis factor-alpha production after a 5-km run*. Eur J Clin Invest, 1998. **28**(10): p. 866-72.
216. Drenth, J.P., et al., *Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production*. J Appl Physiol (1985), 1995. **79**(5): p. 1497-503.
217. Janský, L., P. Reymanová, and J. Kopecký, *Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by Borrelia*. Physiol Res, 2003. **52**(6): p. 593-8.
218. Bouman, A., et al., *The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: increasing sensitivity of human monocytes to endotoxin*. Fertil Steril, 2001. **76**(3): p. 555-9.
219. Schwarz, E., et al., *Influence of the menstrual cycle on the LPS-induced cytokine response of monocytes*. Cytokine, 2000. **12**(4): p. 413-6.
220. Horrigan, L.A., J.P. Kelly, and T.J. Connor, *Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe?* Pharmacol Ther, 2006. **111**(3): p. 877-92.
221. Eigler, A., et al., *Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(1): p. 101-7.
222. Lovallo, W.R., et al., *Cortisol responses to mental stress, exercise, and meals following caffeine intake in men and women*. Pharmacol Biochem Behav, 2006. **83**(3): p. 441-7.
223. Cupps, T.R. and A.S. Fauci, *Corticosteroid-mediated immunoregulation in man*. Immunol Rev, 1982. **65**: p. 133-55.
224. Hung, S.a.F., W, *Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease*. Journal of Biomedical Science, 2017. **24**:47.
225. Rosas-Ballina, M. and K.J. Tracey, *Cholinergic control of inflammation*. J Intern Med, 2009. **265**(6): p. 663-79.


226. Barcelos, R.P., et al., *Caffeine intake may modulate inflammation markers in trained rats*. *Nutrients*, 2014. **6**(4): p. 1678-90.
227. Tatler, A.L., et al., *Caffeine inhibits TGF β activation in epithelial cells, interrupts fibroblast responses to TGF β , and reduces established fibrosis in ex vivo precision-cut lung slices*. *Thorax*, 2016. **71**(6): p. 565-7.
228. Mitani, T., et al., *Caffeine-Stimulated Intestinal Epithelial Cells Suppress Lipid Accumulation in Adipocytes*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2017. **63**(5): p. 331-338.
229. Alexopoulos, N., et al., *The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals*. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2008. **15**(3): p. 300-5.
230. Shechter, M., et al., *Impact of acute caffeine ingestion on endothelial function in subjects with and without coronary artery disease*. *Am J Cardiol*, 2011. **107**(9): p. 1255-61.
231. Ramakers, B.P., et al., *Circulating adenosine increases during human experimental endotoxemia but blockade of its receptor does not influence the immune response and subsequent organ injury*. *Crit Care*, 2011. **15**(1): p. R3.
232. Bishop, N.C., et al., *Effect of caffeine ingestion on lymphocyte counts and subset activation in vivo following strenuous cycling*. *Eur J Appl Physiol*, 2005. **93**(5-6): p. 606-13.
233. Bishop, N.C., et al., *Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion*. *Med Sci Sports Exerc*, 2006. **38**(3): p. 513-9.
234. Steensberg, A., et al., *Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: role of epinephrine*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **281**(3): p. C1001-4.
235. Ferreira, G.A., et al., *The Effects of Acute and Chronic Sprint-Interval Training on Cytokine Responses Are Independent of Prior Caffeine Intake*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 671.
236. Rossi, F.E., et al., *Caffeine supplementation affects the immunometabolic response to concurrent training*. *J Exerc Rehabil*, 2017. **13**(2): p. 179-184.
237. Vieira, J.M., et al., *Caffeine and high intensity exercise: Impact on purinergic and cholinergic signalling in lymphocytes and on cytokine levels*. *Biomed Pharmacother*, 2018. **108**: p. 1731-1738.
238. Bassini-Cameron, A., et al., *Effect of caffeine supplementation on haematological and biochemical variables in elite soccer players under physical stress conditions*. *Br J Sports Med*, 2007. **41**(8): p. 523-30; discussion 530.
239. Nieman, D.C., et al., *Influence of 2-Weeks Ingestion of High Chlorogenic Acid Coffee on Mood State, Performance, and Postexercise Inflammation and Oxidative Stress: A Randomized, Placebo-Controlled Trial*. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2018. **28**(1): p. 55-65.
240. Liang, N. and D.D. Kitts, *Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions*. *Nutrients*, 2015. **8**(1).
241. Marín G., C.P.Q., G.I., *Contenido de ácidos clorogénicos en granos de Coffea arabica y C. canephora, según el desarrollo del fruto*. *Cenicafé*, 2008. **59**(1): p. 7-28.
242. Solís, L.D.H., C.H., *Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de ácidos clorogénicos en café*. *Agronomía Costarricense*, 2015. **29**(2): p. 99-107.
243. Farah, A., et al., *Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(5): p. 1505-13.
244. Farias-Pereira, R., C.S. Park, and Y. Park, *Mechanisms of action of coffee bioactive components on lipid metabolism*. *Food Sci Biotechnol*, 2019. **28**(5): p. 1287-1296.
245. Ludwig, I.A., et al., *Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: what are we drinking?* *Food Funct*, 2014. **5**(8): p. 1718-26.

246. Arai, K., et al., *Simultaneous Determination of Trigonelline, Caffeine, Chlorogenic Acid and Their Related Compounds in Instant Coffee Samples by HPLC Using an Acidic Mobile Phase Containing Octanesulfonate*. Anal Sci, 2015. **31**(8): p. 831-5.
247. Cha, J.W., et al., *The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes*. Biomol Ther (Seoul), 2014. **22**(2): p. 136-42.
248. Li, S., et al., *Chlorogenic acid protects MSCs against oxidative stress by altering FOXO family genes and activating intrinsic pathway*. Eur J Pharmacol, 2012. **674**(2-3): p. 65-72.
249. Shin, H.S., et al., *Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice*. Food Chem. **168**: p. 167-75.
250. Hwang, S.J., et al., *Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells*. Inflamm Res, 2013. **63**(1): p. 81-90.
251. Tajik, N., et al., *The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature*. Eur J Nutr, 2017. **56**(7): p. 2215-2244.
252. Shi, H., *Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway*. Toxicology, 2013. **303**: p. 107-114.
253. Santana-Gálvez, J., L. Cisneros-Zevallos, and D.A. Jacobo-Velázquez, *Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome*. Molecules, 2017. **22**(3).
254. Soga, S., N. Ota, and A. Shimotoyodome, *Stimulation of postprandial fat utilization in healthy humans by daily consumption of chlorogenic acids*. Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**(8): p. 1633-6.
255. Johnston, K.L., M.N. Clifford, and L.M. Morgan, *Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(4): p. 728-33.
256. Kempf, K., et al., *Effects of coffee consumption on subclinical inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: a clinical trial*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(4): p. 950-7.
257. Wedick, N.M., et al., *Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: a randomized controlled trial*. Nutr J, 2011. **10**: p. 93.
258. Kempf, K., et al., *Cardiometabolic effects of two coffee blends differing in content for major constituents in overweight adults: a randomized controlled trial*. Eur J Nutr, 2015. **54**(5): p. 845-54.
259. Saito, M., et al., *Coffee consumption and cystatin-C-based estimated glomerular filtration rates in healthy young adults: results of a clinical trial*. J Nutr Metab, 2011. **2011**: p. 146865.
260. Gavrieli, A., et al., *Caffeinated coffee does not acutely affect energy intake, appetite, or inflammation but prevents serum cortisol concentrations from falling in healthy men*. J Nutr, 2011. **141**(4): p. 703-7.
261. Paiva, C., et al., *Consumption of coffee or caffeine and serum concentration of inflammatory markers: A systematic review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019. **59**(4): p. 652-663.
262. Ohnaka, K., et al., *Effects of 16-week consumption of caffeinated and decaffeinated instant coffee on glucose metabolism in a randomized controlled trial*. J Nutr Metab, 2012. **2012**: p. 207426.


263. Gressner, O.A., et al., *Pharmacological application of caffeine inhibits TGF-beta-stimulated connective tissue growth factor expression in hepatocytes via PPARgamma and SMAD2/3-dependent pathways*. J Hepatol, 2008. **49**(5): p. 758-67.
264. Williams, C.J., et al., *Coffee consumption is associated with higher plasma adiponectin concentrations in women with or without type 2 diabetes: a prospective cohort study*. Diabetes Care, 2008. **31**(3): p. 504-7.
265. Lopez-Garcia, E., et al., *Coffee consumption and markers of inflammation and endothelial dysfunction in healthy and diabetic women*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(4): p. 888-93.
266. Kotani, K., et al., *The relationship between usual coffee consumption and serum C-reactive protein level in a Japanese female population*. Clin Chem Lab Med, 2008. **46**(10): p. 1434-7.
267. Moua, E.D., et al., *Coffee Consumption and C-Reactive Protein Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Nutrients, 2020. **12**(5).
268. Bloomer, R.J., et al., *Safety profile of caffeine and 1,3-dimethylamylamine supplementation in healthy men*. Hum Exp Toxicol, 2013. **32**(11): p. 1126-36.
269. Corrêa, T.A., et al., *Medium light and medium roast paper-filtered coffee increased antioxidant capacity in healthy volunteers: results of a randomized trial*. Plant Foods Hum Nutr, 2012. **67**(3): p. 277-82.
270. Kotyczka, C., et al., *Dark roast coffee is more effective than light roast coffee in reducing body weight, and in restoring red blood cell vitamin E and glutathione concentrations in healthy volunteers*. Mol Nutr Food Res, 2011. **55**(10): p. 1582-6.
271. Martini, D., et al., *Coffee Consumption and Oxidative Stress: A Review of Human Intervention Studies*. Molecules, 2016. **21**(8).
272. Hoelzl, C., et al., *Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules*. Mol Nutr Food Res, 2010. **54**(12): p. 1722-33.
273. Yukawa, G.S., et al., *Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans*. Biochemistry (Mosc), 2004. **69**(1): p. 70-4.
274. Poole, R., et al., *Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes*. BMJ, 2017. **359**: p. j5024.
275. Lovallo, W.R., et al., *Caffeine stimulation of cortisol secretion across the waking hours in relation to caffeine intake levels*. Psychosom Med, 2005. **67**(5): p. 734-9.
276. Rochat, C., et al., *Caffeine Consumption in Switzerland: Results from the First National Nutrition Survey MenuCH*. Nutrients, 2019. **12**(1).
277. Park, H.S., J.Y. Park, and R. Yu, *Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. **69**(1): p. 29-35.
278. Rexrode, K.M., et al., *Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women*. Ann Epidemiol, 2003. **13**(10): p. 674-82.
279. Pou, K.M., et al., *Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2007. **116**(11): p. 1234-41.
280. Suzuki, K., et al., *Exhaustive exercise and type-1/type-2 cytokine balance with special focus on interleukin-12 p40/p70*. Exerc Immunol Rev, 2003. **9**: p. 48-57.
281. Day, K., et al., *Comparison of a Bioelectrical Impedance Device against the Reference Method Dual Energy X-Ray Absorptiometry and Anthropometry for the Evaluation of Body Composition in Adults*. Nutrients, 2018. **10**(10).

ANEXOS

Anexo 1: Resolución del comité de ética



cei comitè d'ètica
de la investigació
ILLES BALEARS



**Govern
de les Illes Balears**
Conselleria de Salut
Direcció General
de Salut Pública i Consum

INFORME DEL COMITÈ DE ÈTICA DE LA INVESTIGACIÓ DE LAS ILLES BALEARS

Ana Aurelia Iglesias Iglesias, Secretaria Tècnica del Comitè de Ètica de la Investigació de las Illes Balears,

CERTIFICO:



Que este Comitè, en la sessió celebrada el dia 24 de setembre (nº 08/14), evaluó los aspectos éticos del proyecto de investigación nº **IB 2399/14 PI**, denominado **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INGESTA DE CAFÉINA Y LA ACTIVIDAD FÍSICA SOBRE EL ESTADO INFLAMATORIO DEL ORGANISMO** del investigador principal Dr. Pedro Tauler del departamento de Biología de UIB, acordando emitir informe favorable para la realización de este proyecto de investigación.

Que el CEI-IB, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de Buena Práctica Clínica.

Que, a la fecha de aprobación de este estudio, la composición del CEI-IB era la siguiente:

Presidente:	Joan Bangay Leonart	Hematología
Vice-presidente:	Joan B. Soriano	Epidemiología
Secretaria:	Ana Aurelia Iglesias Iglesias	Secretaria
Vocales:	Sebastián Alberti Serrano	Biología
	Albano Alonso Fernández	Neumología
	Felip José Bauzá Martorell	Derecho
	Miquel Bennasar Viny	Enfermería
	Bartolomé Bonet Serra	Pediatría
	Isabel M. Borrás Rosselló	Otorrinolaringología
	Francisco Campoamor Landín	Farmacología clínica
	Esther Cardo Julián	Neurología pediátrica
	Magdalena Esteve Canó	Medicina preventiva y salud pública
	Miquel Fiol Sala	Medicina intensiva
	José Mª Gómez Martínez	Cardiología
	Antoni Gamundí Gamundí	Biología
	Cristina Gil Membrado	Derecho
	Ana Aurelia Iglesias Iglesias	Farmacología
Riia Mut Sánchez	Oncología	
Carmen Pasa Iglesias	Farmacología	
José Ignacio Ramírez Manent	Medicina familiar y comunitaria	
Pere Riuord Sbert	Estomatología	
Llorenç Socias Crespi	Medicina intensiva	
Cristina Vilena Portella	Biología	

Palma, 24 de septiembre de 2014

comitè d'ètica
de la investigació
ILLES BALEARS
Conselleria de Salut

Anexo 2: Cuaderno de recogida de datos para el estudio A

CODIGO: _____

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

DEP2013-45966-P

Evaluación de los efectos de la ingesta de cafeína y la actividad física sobre el estado inflamatorio del organismo (CAFINEX)

ESTUDIO A

Investigador principal: Pedro Tauler Riera



Universitat
de les Illes Balears

Fecha:

Hora visita:

Criterios de exclusión:

- presencia de enfermedad (incluidos resfriados)
- toma habitual de analgésicos o antiinflamatorios
- consumo elevado de alcohol (más de 20 unidades semanales)
(1 caña o 1 vaso de vino equivalen a 1 unidad, 1 combinado equivale a 2 unidades)
- realizar semanalmente más de 10 horas de actividad física
- haber experimentado una variación de peso superior al 5% en los últimos 3 meses

Edad (años): _____

Sexo: Hombre Mujer

Si mujer, fecha última regla: _____

Ocupación: _____

Fumador: Si No

Si fumador, número de cigarrillos día: _____

Datos antropométricos y bioimpedancia

Altura _____cm

Peso _____ kg

BMI _____ kg/m²

Metabolismo Basal _____ kcal/día

Masa grasa _____kg _____%

Masa magra _____kg

Agua Total _____L

Masa visceral _____

CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FISICA (IPAQ)

Piense en las actividades **intensas** que usted ha realizado **habitualmente en los últimos meses**. Las actividades físicas **intensas** se refieren a aquellas que implican un esfuerzo físico intenso y que lo hacen respirar mucho más intensamente que lo normal. Piense **solo** en aquellas actividades físicas que realizó durante por lo menos **10 minutos** seguidos.

1. ¿en cuántos **días por semana** realizó actividades físicas **intensas** tales como levantar pesos pesados, cavar, hacer ejercicios aeróbicos o andar rápido en bicicleta?

_____ **días por semana**

2. Los días que realizó esta actividad física **intensa**, ¿cuánto tiempo dedicó a realizarla?

_____ **horas por día** _____ **minutos por día**

Piense en todas las actividades moderadas que usted ha realizado habitualmente en los últimos meses. Las actividades moderadas son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado que lo hace respirar algo más intensamente que lo normal. Piense solo en aquellas actividades físicas que realizó durante por lo menos 10 minutos seguidos.

3. ¿en cuántos **días por semana** hizo actividades físicas **moderadas** como transportar pesos livianos, andar en bicicleta a velocidad regular o jugar dobles de tenis? **No** incluya caminar.

_____ **días por semana**

4. Los días que realizó esta actividad física **moderada**, ¿cuánto tiempo dedicó a realizarla?

_____ **horas por día** _____ **minutos por día**

Piense en el tiempo que usted dedicó a **caminar habitualmente en los últimos meses**. Esto incluye caminar en el trabajo o en la casa, para trasladarse de un lugar a otro, o cualquier otra caminata que usted podría hacer solamente para la recreación, el deporte, el ejercicio o el ocio.

5. ¿En cuántos **días por semana caminó** por lo menos **10 minutos** seguidos?

_____ **días por semana**

6. Habitualmente, ¿cuánto tiempo en total dedicó a caminar en uno de esos días?

_____ **horas por día** _____ **minutos por día**

La última pregunta es acerca del tiempo que pasó usted **sentado** durante los días hábiles de forma habitual (**últimos meses**). Esto incluye el tiempo dedicado al trabajo, en la casa, en una clase, y durante el tiempo libre. Puede incluir el tiempo que pasó sentado ante un escritorio, visitando amigos, leyendo, en coche, o sentado o recostado mirando la televisión.

7. Durante los **meses** ¿cuánto tiempo pasó **sentado** de media?

_____ **horas por día** _____ **minutos por día**

Cuestionario de consumo habitual de cafeína

Anotar la cantidad diaria o semanal, según corresponda, ingerida de cada producto de la forma más descriptiva (**una lata coca cola, taza de cafetería, dos cucharadas de postre de café soluble, etc.**), así como otra información como forma de preparación, si procede (por ejemplo cafetera italiana, de bar, tipo Nespresso®, etc.), marca comercial, etc.

Importante: si son productos descafeinados también deben incluirse y debe indicarse en el apartado de otra información.

Producto		Cantidad		Otra información
		Por día	Por semana	
Café (expreso)				
Café americano				
Café con leche				
Cortado				
Café soluble (Nescafé® y otros)				
Té	Verde			
	Negro			
Mate				
Chocolate	Con leche			
	Negro			
Chocolate a la taza				
Bebidas con cola (Coca-Cola®, Pepsi- cola®, etc.)				
Bebidas energéticas (Red-Bull®, etc.)				
Geles energéticos				
Productos farmacológicos				

CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

1. ¿Usa usted principalmente el aceite de oliva para cocinar? (SI/NO)

2. ¿Cuánto aceite de oliva (cucharadas soperas) consume en total al día (incluyendo el usado para freír, el de las comidas fuera de casa, las ensaladas, etc.)?

3. a) ¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día (las guarniciones o acompañamientos contabilizan como ½ ración)?

- b) ¿Cuántas de estas raciones son en forma de ensalada o verduras crudas?

4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día?

5. ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día (una ración equivale a 100-150 g)?

6. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día (una porción individual equivale a 12 g)?

7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, tónicas, bitter, zumos comerciales) consume al día?

8. a) ¿Bebe vino? (SI/NO)

- b) En caso que beba vino, ¿cuánto consume a la semana?

9. ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana (una ración o plato equivale a 150 g)?

10. ¿Cuántas raciones de pescado o mariscos consume a la semana (un plato, pieza o ración equivale a 100-150 g de pescado ó 4-5 piezas de marisco)?
11. ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulces o pasteles a la semana?
12. ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana (una ración equivale a 30 g)?
13. ¿Consume preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas (carne de pollo: una pieza o ración equivale a 100-150 g)? (SI/NO)
14. ¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, el arroz u otros platos aderezados con una salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)?

Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

Alimentos/ Cantidades	MENSUAL		SEMANAL			DIARIO			
	Nunca o menos de una vez al mes	1-3 veces al mes	1-2 veces a la semana	3-4 veces a la semana	5-6 veces a la semana	1 vez al día	2-3 veces al día	4-5 veces al día	6 o más veces al día
Leche entera (una taza grande)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leche semi (una taza grande)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leche desnatada (una taza grande)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yogur (una unidad)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Postres lácteos (flan, natillas, helado, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Queso curado o semicurado (manchego) (una loncha de 50 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Requesón, queso fresco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Copos de cereales (un bol)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Galletas maría (4 galletas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pan blanco (una rebanada)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pan moreno o integral (una rebanada)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasta y arroz blanco (un plato)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasta y arroz integral (un plato)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plato de verdura cruda (ensaladas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plato de verdura cocinada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patatas (un plato normal)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Judías, garbanzos, lentejas (un plato normal)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jamón serrano (una loncha)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jamón york, pavo cocido (una loncha)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fuet, salami, chorizo (tres lonchas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Aceite de oliva (1 cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceite otros vegetales (1 cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Margarina (1 cucharada de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nata, mantequilla	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Huevos de gallina (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carne de ternera, cerdo y cordero (un filete, un bistec o un entrecot)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pollo o pavo, conejo (1/4 pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hamburguesas (una)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado blanco (merluza, lenguado, rape, etc.) (una pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado azul (Salmón, sardinas, atún) (una rodaja)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mejillones, gambas o similares (un plato)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado en conserva (una lata)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruta (una pieza) o zumo natural (1 vaso)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruta desecada (dátiles, pasas, 1 puñado)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10 Aceitunas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patatillas y snacks (un puñado)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Almendras, avellanas y nueces (un puñado)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Chocolate (una chocolatina) o cacao (dos cucharadas de postre)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bollería (croissants, ensaimada)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasteles (una porción, 150 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Azúcar (una cucharada de café)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Refrescos (un vaso, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Zumo de fruta comercial (un vaso)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vino, cava, cerveza (medio vaso)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

¿Qué comidas realizas a lo largo del día?

Desayuno mañana Media mañana Comida Merienda tarde Cena

Toma muestra sangreMuestra EDTA Muestra heparina **Hemograma y recuento de leucocitos**

Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$)	Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)
Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)
Hematocrito (%)	Linfocitos (%)
VCM (μL)	Monocitos (%)
HCM (pg)	Eosinófilos (%)
CHCM (%)	Basófilos (%)
RDW (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	

Determinaciones en suero y plasma

IL-10
IL-6
Proteína C reactiva
TNF-α
IL-1β
Adiponectina

Anexo 3: Cuaderno de recogida de datos para el estudio B

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Evaluación de los efectos de la ingesta de cafeína y la actividad física sobre el estado inflamatorio del organismo (CAFINEX)

ESTUDIO B



VISITA 0

CODIGO: _____

FECHA:

Hora visita:

Criterios de inclusión

-sujetos habituales consumidores de cafeína (en forma de café o refrescos de cola, o suplementos), lo que ayuda a asegurar que el sujeto es compatible con la toma del suplemento de cafeína.

-varones con una edad entre 20 y 45 años

-horas de entrenamiento semanal: mínimo de 8 horas a la semana incluidas competiciones

-no fumadores

Criterios de exclusión

-haber tomado analgésicos o antiinflamatorios en las 2 semanas previas al estudio.

-consumo elevado de alcohol

-tener patologías incompatibles con la toma de dosis altas de
cafeína

-presentar alguna enfermedad o problema de cara a la práctica
deportiva

Edad (años): _____

Ocupación: _____

Datos antropométricos y bioimpedancia

Altura _____ cm

Peso _____ kg

BMI _____ kg/m²

Metabolismo Basal _____ kcal/día

Masa grasa _____ kg _____ %

Masa magra _____ kg

Agua Total _____ L

Masa visceral _____

ANTROPOMETRÍA

PLIEGUES			
Localización	1ª medición	2ª medición	3ª medición
TRICIPITAL			
SUBESCAPULAR			
SUPRAILIACO			
ABDOMINAL			
PERÍMETROS			
BRAZO CONTRAÍDO			
PIERNA MEDIAL			
DIÁMETROS			
HÚMERO			
FÉMUR			

CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FISICA (IPAQ)

Piense en todas las actividades **intensas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Las actividades físicas **intensas** se refieren a aquellas que implican un esfuerzo físico intenso y que lo hacen respirar mucho más intensamente que lo normal. Piense *solo* en aquellas actividades físicas que realizó durante por lo menos **10 minutos** seguidos.

8. Durante los **últimos 7 días**, ¿en cuántos realizó actividades físicas **intensas** tales como levantar pesos pesados, cavar, hacer ejercicios aeróbicos o andar rápido en bicicleta?

_____ **días por semana**

9. Los días que realizó esta actividad física **intensa**, ¿cuánto tiempo dedicó a realizarla?

_____ **horas por día** _____ **minutos por día**

Piense en todas las actividades moderadas que usted realizó en los últimos 7 días. Las actividades moderadas son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado que lo hace respirar algo más intensamente que lo normal. Piense *solo* en aquellas actividades físicas que realizó durante por lo menos 10 minutos seguidos.

10. Durante los **últimos 7 días**, ¿en cuántos días hizo actividades físicas **moderadas** como transportar pesos livianos, andar en bicicleta a velocidad regular o jugar dobles de tenis? **No** incluya caminar.

_____ **días por semana**

11. Los días que realizó esta actividad física **moderada**, ¿cuánto tiempo dedicó a realizarla?

_____ **horas por día** _____ **minutos por día**

Piense en el tiempo que usted dedicó a **caminar** en los **últimos 7 días**. Esto incluye caminar en el trabajo o en la casa, para trasladarse de un lugar a otro, o cualquier otra caminata que usted podría hacer solamente para la recreación, el deporte, el ejercicio o el ocio.

12. Durante los **últimos 7 días**, ¿En cuántos **camino** por lo menos **10 minutos** seguidos?

_____ **días por semana**

13. Habitualmente, ¿cuánto tiempo en total dedicó a caminar en uno de esos días?

_____ **horas por día** _____ **minutos por día**

La última pregunta es acerca del tiempo que pasó usted **sentado** durante los días hábiles de los **últimos 7 días**. Esto incluye el tiempo dedicado al trabajo, en la casa, en una clase, y durante el tiempo libre. Puede incluir el tiempo que pasó sentado ante un escritorio, visitando amigos, leyendo, en coche, o sentado o recostado mirando la televisión.

14. Durante los **últimos 7 días** ¿cuánto tiempo pasó **sentado** de media?

_____ **horas por día** _____ **minutos por día**

Cuestionario de consumo habitual de cafeína

Anotar la cantidad diaria o semanal, según corresponda, ingerida de cada producto de la forma más descriptiva (**una lata coca cola, taza de cafetería, dos cucharadas de postre de café soluble, etc.**), así como otra información como forma de preparación, si procede (por ejemplo cafetera italiana, de bar, tipo Nespresso®, etc.), marca comercial, etc.

Importante: si son productos descafeinados también deben incluirse y debe indicarse en el apartado de otra información.

Producto	Cantidad		Otra información
	Por día	Por semana	
Café (expreso)			
Café americano			
Café con leche			
Cortado			
Café soluble (Nescafé® y otros)			
Té	Verde		
	Negro		
Mate			
Chocolate	Con leche		
	Negro		
Chocolate a la taza			
Bebidas con cola (Coca-Cola®, Pepsi- cola®, etc.)			
Bebidas energéticas (Red-Bull®, etc.)			
Geles energéticos			
Productos farmacológicos			

Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

Alimentos/ Cantidades	MENSUAL		SEMANAL			DIARIO			
	Nunca o menos de una vez al mes	1-3 veces al mes	1-2 veces a la semana	3-4 veces a la semana	5-6 veces a la semana	1 vez al día	2-3 veces al día	4-5 veces al día	6 o más veces al día
Leche entera (una taza grande)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leche semi (una taza grande)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leche con cacao (una taza grande)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yogur entero (una unidad)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Queso curado o semicurado (manchego) (una loncha de 50 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Requesón, queso fresco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Copos de cereales (un bol)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pan (una rebanada)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasta y arroz (un plato)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plato de verdura cruda (ensaladas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plato de verdura cocinada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patatas (un plato normal)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Judías, garbanzos, lentejas (un plato normal)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jamón serrano (una loncha)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jamón York (una loncha)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fuet, salami, chorizo (tres lonchas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceite de oliva (1 cuch. sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceite otros vegetales (1 cucharada sopera)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Margarina (1 cuch. de postres)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nata, mantequilla	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Huevos de gallina (uno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carne de ternera, cerdo y cordero (un filete, un bistec o un entrecot)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pollo o pavo, conejo (1/4 pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hamburguesas (una)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado blanco (merluza, lenguado, rape, etc.) (una pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado azul (Salmón, sardinas, atún) (una rodaja)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mejillones, gambas o similares (un plato)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado en conserva (una lata)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruta fresca (una pieza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fruta desecada (Dátiles, pasas, 100 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10 Aceitunas, aguacate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Almendras, avellanas y nueces (un puñado)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Chocolate (una chocolatina)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bollería (croissants , Ensaimada)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasteles (una porción, 150 g)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Azúcar (una cucharada de café)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Refrescos (un vaso, 200 ml)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zumo de fruta comercial (un vaso)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vino, cava, cerveza (medio vaso)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

REGISTRO DIETÉTICO DE UNA SEMANA

Es importante anotar con la mayor exactitud todos los alimentos y bebidas que vaya tomando

código

Deporte

DIA 1**FECHA : ____ - ____ - ____ Día de la semana :**

	ALIMENTOS (Detallar: descripción, tipo, marca y cantidad , y la forma de preparación : a la plancha, frito, hervido...)		LUGAR (casa, restaurante...)
DESAYUNO Hora:			
	Leche: tipo Pan: tipo Azúcar Zumo fruta		
Merienda media mañana			
Comida Hora:	Aperitivo 1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/fruta Café Aceite		
Merienda tarde			
Cena Hora:	1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/ fruta Café Aceite		
Entre horas			

ES IMPORTANTE ANOTAR LAS BEBIDAS Y SI SE HA TOMADO ALGUN SUPLEMENTO

DIA 2

FECHA : ____ - ____ - ____ **Día de la semana:**

	ALIMENTOS <small>(Detallar: descripción, tipo, marca y cantidad, y la forma de preparación: a la plancha, frito, hervido...)</small>	LUGAR <small>(casa, restaurante...)</small>
DESAYUNO Hora:	<p>Leche: tipo</p> <p>Pan: tipo</p> <p>Azúcar</p> <p>Zumo fruta</p>	
<i>Merienda media mañana</i>		
Comida Hora:	<p>Aperitivo</p> <p>1er Plato</p> <p>2on Plato</p> <p>Pan</p> <p>Bebida</p> <p>Postre/fruta</p> <p>Café</p> <p>Aceite</p>	
<i>Merienda tarde</i>		
Cena Hora:	<p>1er Plato</p> <p>2on Plato</p> <p>Pan</p> <p>Bebida</p> <p>Postre/ fruta</p> <p>Café</p> <p>Aceite</p>	
Entre horas		

ES IMPORTANTE ANOTAR LAS BEBIDAS Y SI SE HA TOMADO ALGUN SUPLEMENTO

DIA 3

FECHA : ____ - ____ - ____ Día de la semana:

	ALIMENTOS (Detallar: descripción, tipo, marca y cantidad, y la forma de preparación: a la plancha, frito, hervido...)		LUGAR (casa, restaurante...)
DESAYUNO Hora:			
	Leche: tipo Pan: tipo Azúcar Zumo fruta		
Merienda media mañana			
Comida Hora:	Aperitivo 1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/fruta Café Aceite		
Merienda tarde			
Cena Hora:	1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/ fruta Café Aceite		
Entre horas			

ES IMPORTANTE ANOTAR LAS BEBIDAS Y SI SE HA TOMADO ALGUN SUPLEMENTO

DIA 4

FECHA : ____ - ____ - ____ **Día de la semana:**

	ALIMENTOS <small>(Detallar: descripción, tipo, marca y cantidad, y la forma de preparación: a la plancha, frito, hervido...)</small>	LUGAR <small>(casa, restaurante...)</small>
<i>DESAYUNO</i> Hora:	Leche: tipo Pan: tipo Azúcar Zumo fruta	
<i>Merienda media mañana</i>		
<i>Comida</i> Hora:	Aperitivo 1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/fruta Café Aceite	
<i>Merienda tarde</i>		
<i>Cena</i> Hora:	1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/ fruta Café Aceite	
Entre horas		

ES IMPORTANTE ANOTAR LAS BEBIDAS Y SI SE HA TOMADO ALGUN SUPLEMENTO

DIA 5

FECHA : ____ - ____ - ____ **Día de la semana:**

	ALIMENTOS <small>(Detallar: descripción, tipo, marca y cantidad, y la forma de preparación: a la plancha, frito, hervido...)</small>	LUGAR <small>(casa, restaurante...)</small>
<i>DESAYUNO</i> Hora:	Leche: tipo Pan: tipo Azúcar Zumo fruta	
<i>Merienda media mañana</i>		
<i>Comida</i> Hora:	Aperitivo 1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/fruta Café Aceite	
<i>Merienda tarde</i>		
<i>Cena</i> Hora:	1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/ fruta Café Aceite	
Entre horas		

ES IMPORTANTE ANOTAR LAS BEBIDAS Y SI SE HA TOMADO ALGUN SUPLEMENTO

DIA 6

FECHA : ____ - ____ - ____ Día de la semana:

	ALIMENTOS <small>(Detallar: descripción, tipo, marca y cantidad, y la forma de preparación: a la plancha, frito, hervido...)</small>	LUGAR <small>(casa, restaurante...)</small>
<i>DESAYUNO</i> Hora:	Leche: tipo Pan: tipo Azúcar Zumo fruta	
<i>Merienda media mañana</i>		
<i>Comida</i> Hora:	Aperitivo 1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/fruta Café Aceite	
<i>Merienda tarde</i>		
<i>Cena</i> Hora:	1er Plato 2on Plato Pan Bebida Postre/ fruta Café Aceite	
Entre horas		

ES IMPORTANTE ANOTAR LAS BEBIDAS Y SI SE HA TOMADO ALGUN SUPLEMENTO

DIA 7**FECHA : ____ - ____ - ____ Día de la semana:**

	ALIMENTOS (Detallar: descripción, tipo, marca y cantidad, y la forma de preparación: a la plancha, frito, hervido...)	LUGAR (casa, restaurante...)
<i>DESAYUNO</i> Hora:	<p>Leche: tipo</p> <p>Pan: tipo</p> <p>Azúcar</p> <p>Zumo fruta</p>	
<i>Merienda media mañana</i>		
<i>Comida</i> Hora:	<p>Aperitivo</p> <p>1er Plato</p> <p>2on Plato</p> <p>Pan</p> <p>Bebida</p> <p>Postre/fruta</p> <p>Café</p> <p>Aceite</p>	
<i>Merienda tarde</i>		
<i>Cena</i> Hora:	<p>1er Plato</p> <p>2on Plato</p> <p>Pan</p> <p>Bebida</p> <p>Postre/ fruta</p> <p>Café</p> <p>Aceite</p>	
Entre horas		

ES IMPORTANTE ANOTAR LAS BEBIDAS Y SI SE HA TOMADO ALGUN SUPLEMENTO

Determinación de VO₂máx.

VO ₂ máx.	
Umbral aeróbico	
Umbral anaeróbico	
FC máx. alcanzada	
70% VO ₂ máx	
Velocidad correspondiente a 70% VO ₂ máx	

VISITA 1

CODIGO: _____

FECHA: _____

Hora visita:

Toma muestras de sangre

Basal:

Muestra sangre EDTA

Muestra sangre heparina

Inmediatamente después de la prueba:

Muestra sangre EDTA

Muestra sangre heparina

Dos horas después de la prueba:

Muestra sangre EDTA

Muestra sangre heparina

Registro de frecuencia cardiaca durante el ejercicio

Frecuencia cardiaca máxima: _____

Frecuencia cardiaca media: _____

Peso participante

Antes ejercicio: _____kg

Después ejercicio: _____kg

Agua consumida durante la prueba

Volumen inicial (antes prueba): _____ml

Volumen final (después prueba): _____ml

Determinaciones muestras pre-ejercicio**Hemograma y recuento de leucocitos**

Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$)	Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)
Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)
Hematocrito (%)	Linfocitos (%)
VCM (μL)	Monocitos (%)
HCM (pg)	Eosinófilos (%)
CHCM (%)	Basófilos (%)
RDW (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	

Determinaciones en suero y plasma

IL-10	IFN- γ
IL-6	AMPc
IL-2	Adrenalina
IL-4	Cortisol
IL-1 β	Cafeína
IL-12 p40	

Determinaciones en muestras estimuladas

IL-10	TNF- α
IL-6	

Determinaciones muestras post-ejercicio**Hemograma y recuento de leucocitos**

Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$)	Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)
Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)
Hematocrito (%)	Linfocitos (%)
VCM (μL)	Monocitos (%)
HCM (pg)	Eosinófilos (%)
CHCM (%)	Basófilos (%)
RDW (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	

Determinaciones en suero y plasma

IL-10	IFN- γ
IL-6	AMPc
IL-2	Adrenalina
IL-4	Cortisol
IL-1 β	Cafeína
IL-12 p40	

Determinaciones en muestras estimuladas

IL-10	TNF- α
IL-6	

Determinaciones muestras post-recuperación**Hemograma y recuento de leucocitos**

Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$)	Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)
Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)
Hematocrito (%)	Linfocitos (%)
VCM (μL)	Monocitos (%)
HCM (pg)	Eosinófilos (%)
CHCM (%)	Basófilos (%)
RDW (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	

Determinaciones en suero y plasma

IL-10	IFN- γ
IL-6	AMPc
IL-2	Adrenalina
IL-4	Cortisol
IL-1 β	Cafeína
IL-12 p40	

Determinaciones en muestras estimuladas

IL-10	TNF- α
IL-6	

VISITA 2

CODIGO: _____

FECHA: _____

Hora visita:

Toma muestras de sangre y saliva

Basal:

Muestra sangre EDTA

Muestra sangre heparina

Inmediatamente después de la prueba:

Muestra sangre EDTA

Muestra sangre heparina

Dos horas después de la prueba:

Muestra sangre EDTA

Muestra sangre heparina

Registro de frecuencia cardiaca durante el ejercicio

Frecuencia cardiaca máxima: _____

Frecuencia cardiaca media: _____

Peso participante

Antes ejercicio: _____kg

Después ejercicio: _____kg

Agua consumida durante la prueba

Volumen inicial (antes prueba): _____ml

Volumen final (después prueba): _____ml

Determinaciones muestras pre-ejercicio**Hemograma y recuento de leucocitos**

Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$)	Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)
Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)
Hematocrito (%)	Linfocitos (%)
VCM (μL)	Monocitos (%)
HCM (pg)	Eosinófilos (%)
CHCM (%)	Basófilos (%)
RDW (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	

Determinaciones en suero y plasma

IL-10	IFN- γ
IL-6	AMPc
IL-2	Adrenalina
IL-4	Cortisol
IL-1 β	Cafeína
IL-12 p40	

Determinaciones en muestras estimuladas

IL-10	TNF- α
IL-6	

Determinaciones muestras post-ejercicio**Hemograma y recuento de leucocitos**

Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$)	Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)
Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)
Hematocrito (%)	Linfocitos (%)
VCM (μL)	Monocitos (%)
HCM (pg)	Eosinófilos (%)
CHCM (%)	Basófilos (%)
RDW (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	

Determinaciones en suero y plasma

IL-10	IFN- γ
IL-6	AMPc
IL-2	Adrenalina
IL-4	Cortisol
IL-1 β	Cafeína
IL-12 p40	

Determinaciones en muestras estimuladas

IL-10	TNF- α
IL-6	

Determinaciones muestras post-recuperación**Hemograma y recuento de leucocitos**

Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$)	Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$)
Hemoglobina (g/dL)	Neutrófilos (%)
Hematocrito (%)	Linfocitos (%)
VCM (μL)	Monocitos (%)
HCM (pg)	Eosinófilos (%)
CHCM (%)	Basófilos (%)
RDW (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	

Determinaciones en suero y plasma

IL-10	IFN- γ
IL-6	AMPc
IL-2	Adrenalina
IL-4	Cortisol
IL-1 β	Cafeína
IL-12 p40	

Determinaciones en muestras estimuladas

IL-10	TNF- α
IL-6	

