

**NUEVOS PARADIGMAS DE LA INGESTA DE CAFÉINA Y
SUS EFECTOS DURANTE EL EJERCICIO: MECANISMOS
Y TOLERANCIA A LOS BENEFICIOS ERGOGÉNICOS DE
UNA INGESTA CONTINUADA**

Autor
Carlos Ruiz Moreno

Director
Dr. Juan Del Coso Garrigós

Tutora
Dra. Beatriz Lara López

MADRID 2021



FACULTAD DE SALUD
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**NUEVOS PARADIGMAS DE LA INGESTA DE CAFÉINA Y
SUS EFECTOS DURANTE EL EJERCICIO: MECANISMOS
Y TOLERANCIA A LOS BENEFICIOS ERGOGÉNICOS DE
UNA INGESTA CONTINUADA**

Autor
Carlos Ruiz Moreno

Director
Dr. Juan Del Coso Garrigós

Tutora
Dra. Beatriz Lara López

MADRID 2021

*Dedicado a mis padres José, Elia, y a mi hermana.
Sin ellos este proceso no hubiese sido igual.
Gracias por ser la luz de mí vida.*



AGRADECIMIENTOS

Primero agradecer a la Universidad Camilo José Cela, por aportarme el material suficiente para la realización de las investigaciones. Por otro lado, ser una institución tan importante en mi formación académica. Además, a la institución SEK por contratarme y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente como profesor.

A todos mis compañeros del Grado en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte, que me han aportado felicidad. Concretamente, Jesús Escudero Carvajal que a parte de ser un magnifico compañero, hoy en día es mi mejor amigo, por estar siempre a mi lado, además de ser un ejemplo de constancia en lo que a sus objetivos respecta. También a Sergio Linares, que ha sido una de las personas más influyentes para mi, en la manera de vivir la profesionalidad y la vida.

A mi gran amigo Ángel Ramos Marcos, que a parte de darme la amistad más pura que se puede dar, ha sido gran parte de este documento dado que participó como sujeto en las investigaciones.

A la familia Trillo Yubero, por hacerme uno más de la familia durante todo el proceso. Especialmente a Nerea, que en esta época fue mi compañera de vida y me apoyo en absolutamente en todos los momentos, los buenos, regulares y malos. Por estar en todos los momentos más importantes a nivel profesional. Gracias, por haber sido mi dosis de cafeína diaria.

A Vanesa Meléndez Sánchez, por ser mi mejor amiga, levantándome día a día, dando sentido al “todo pasa por algo” y enseñándome el verdadero significado de la libertad. Por hacerme ver, que los pilares de la vida nunca se pueden olvidar, y que siempre tienes que agradecer que están ahí, porque en algún momento te van a tener que sostener. Por otro lado, ser para mí un ejemplo de profesionalidad y de esfuerzo diario.

A Verónica Giráldez Costas, por ser mi gran compañera y amiga de laboratorio. Por enseñarme que el tiempo de cada uno es lo mas importante que tiene, y por darme fuera del trabajo conversaciones que me aportan una manera de ver la vida diferente.

A Francisco Areces por haber confiado en mi desde el principio, por ofrecerme siempre todo lo que tenía, y por ser el mejor jefe que uno puede tener por su humanidad, humildad y por enseñarme a dar todo por sus alumnos y compañeros.

A Millán Aguilar Navarro, por ser una de las mejores personas que me ha dado este proceso de Tesis Doctoral, por ser un ejemplo de trabajo, sacrificio, y por enseñarme que, para crecer, hay que empezar desde abajo.

A Jorge Gutiérrez Hellín, por ser mi guía desde el principio, por apoyarme en este proceso desde dentro, y ayudarme en mucho más que a lo que la investigación respecta.

A Jaime González, por ayudarme y colaborar en todo este proceso tan difícil, y por contribuir en las publicaciones con su tiempo y talento.

A Diego Brito y Gabriel Baltazar, por hacer que el laboratorio fuese un gran caldo de cultivo para mi aprendizaje.

A mis padres, por darme todo lo que he necesitado. Por haber estado en todos los momentos importantes de mi vida apoyándome como si fuesen suyos. Por luchar para que llegase a donde estoy hoy, y por enseñarme los valores de la humildad y el ser buena persona. Enseñarme lo blanco, negro y las diferentes tonalidades de grises que tiene la vida. Se me quedan cortas las palabras, porque verdaderamente todo esto es gracias a vosotros.

A mi hermana, por enseñarme lo que es la pasión por una labor, por ser la que verdaderamente me ha enseñado a luchar todos los días por lo que quieres a pesar de las adversidades. Por ser un ejemplo de talento en un ámbito laboral. Por todos los valores que enseña a sus hijos y que me aportan tanto. Por ser la superheroína de la familia.

A Ascensión, por ser mi segunda madre, por quererme como si fuese su hijo y alegrarse siempre de nuestros éxitos, y por estar ahí siempre que la he necesitado dando su opinión aunque no me gustase, por guiarme como si fuese para ella.

Al grupo de la comida, Ester Jiménez, Víctor Jiménez, Marcos Soriano y Asier Mañas, por la sencillez que desprenden siendo talento, porque hacen que los días en la universidad se hagan más ameno, y aprenda algo nuevo cada día a su lado.

A todos los profesores de la UCJC que siguen Teresa García Pastor, Diana Ruiz Vicente, Cesar Gallo, Bruno García, me diesen clase o no, que han influido en mi formación, y que en la actualidad, tengo la suerte que me traten como uno más.

A Juan José Salinero, por siempre estar cuando le he necesitado. Porque cuando me junto con el me contagia de alegría y tranquilidad.

A mi Tutora de Tesis Doctoral Beatriz Lara López, por enseñarme que este proceso es muy duro. Por darme mucho llevándose de mi poco. Por enseñarme a luchar por la investigación, y hacerme ver que este proceso son las personas y no las maquinas. Por mostrarme que hay excelentes personas en el mundo de la investigación como es ella, y enseñarme que la humildad tiene que ir siempre unido al trabajo. Y por ultimo, confiar en mi desde el principio.

A mi Director de Tesis Doctoral Juan Del Coso Garrigós, por ser un ejemplo como profesional y humano. Por tener la paciencia suficiente para enseñarme en este proceso. Por ser el mayor ejemplo en el cual, el talento más el trabajo es el resultado de la excelencia. Por ser la mejor referencia que un alumno de doctorado ha podido tener.

AGRADECIMIENTOS	07
ÍNDICE	11
ABREVIATURAS USADAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	17
ÍNDICE DE TABLAS	23
RESUMEN	27
ABSTRACT	31
MARCO TEÓRICO	35
La cafeína a través de la historia en el deporte y la ciencia	37
La ergogenicidad de la cafeína	40
Mecanismos asociados a la ingesta aguda y crónica de cafeína en humanos	44
Cafeína, intensidad del ejercicio y oxidación de sustratos energéticos	47
Ingesta crónica de cafeína y efectos en el rendimiento físico	49
Efectos secundarios y adversos asociados a la ingesta de cafeína aguda y crónica ...	50
Respondedores vs. no respondedores a la ingesta de cafeína	55
OBJETIVOS	59
HIPÓTESIS	63
INVESTIGACIONES	63
ESTUDIO 1: LA INGESTA AGUDA DE CAFEÍNA AUMENTA LA SATURACIÓN DE OXÍGENO DEL MÚSCULO DURANTE UNA PRUEBA DE EJERCICIO DE INCRE- MENTO MÁXIMO	68
Objetivos	68
Material y métodos	68
Resultados	72

ESTUDIO 2: LA INGESTA AGUDA DE CAFÉINA NO MODIFICA LA SATURACIÓN DE OXÍGENO DEL MÚSCULO DURANTE LA PRUEBA DE TEST ANAERÓBICO WINGATE DE 15 SEGUNDOS	74
Objetivos	74
Materiales y métodos	74
Resultados	77
ESTUDIO 3: LA CAFÉINA AUMENTA LA OXIDACIÓN DE LA GRASA DE TODO EL CUERPO DURANTE 1 HORA DE CICLISMO EN FATMAX	80
Objetivos	80
Materiales y métodos	80
Resultados	85
ESTUDIO 4: CURSO DE TIEMPO DE TOLERANCIA A LOS BENEFICIOS DEL RENDIMIENTO DE LA CAFÉINA	89
Objetivos	89
Materiales y métodos	89
Resultados	94
ESTUDIO 5: TOLERANCIA AL EFECTO DE LA CAFÉINA EN EL SEGUNDO UMBRAL VENTILATORIO DURANTE UNA PRUEBA DE TEST INCREMENTAL DE CICLISMO	108
Objetivos	108
Materiales y métodos	108
Resultados	110
ESTUDIO 6: CICLO DE TOLERANCIA A LOS EFECTOS ADVERSOS ASOCIADOS CON LA INGESTIÓN DE UNA DOSIS MODERADA DE CAFÉINA	115
Objetivos	115
Materiales y métodos	115
Resultados	116

ESTUDIO 7: REFUTAR EL MITO DE LA FALTA DE RESPUESTA A LOS EFECTOS	
ERGOGÉNICOS DE LA INGESTIÓN DE CAFEÍNA	124
Objetivos	124
Materiales y métodos	124
Resultados	124
DISCUSIÓN	129
Beneficios ergogénicos de la cafeína tras una ingesta aguda y su habitación tras una ingesta continuada	131
Mecanismos efectores de la ergogenicidad de la cafeína y su habitación	135
La ingesta de cafeína y la intensidad de ejercicio incrementa la oxidación de grasas	138
Adversidades de la ingesta de cafeína aguda y crónica en el deporte	140
Respuesta individual a la cafeína en el rendimiento deportivo	142
LIMITACIONES DE LA TESIS DOCTORAL	147
CONCLUSIONES	153
APLICACIONES PRÁCTICAS DE LA TESIS DOCTORAL	157
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	161
BIBLIOGRAFÍA	167
ANEXOS	187

ABREVIATURAS USADAS

°C: Grados Centígrados

ANOVA: *Analysis of Variance* (análisis de varianza) por sus siglas en inglés.

CHO: Carbohidratos

CO₂: Oxido de carbono diatómico

cm: Centímetros

DS: Desviación Estándar

d: Tamaño del Efecto de Cohen

ES: *Effect Size* (Tamaño del Efecto) por sus siglas en inglés.

Fatmax: Intensidad del ejercicio a la que se obtiene la máxima tasa de oxidación de grasas

FC: Frecuencia Cardíaca

FCmax: Frecuencia Cardíaca Máxima

IC: Intervalo de Confianza

i.e: Por Ejemplo

JCR: *Journal Citation Reports* (informe de citas de revistas) por sus siglas en inglés.

Kg: Kilogramos

L: Litros

MFO: *Maximal Fat Oxidation* (máxima oxidación de grasas) por sus siglas en inglés.

mg: Miligramos

min: Minutos

mmol: Minimoles

NIRS: *Near Infrared Spectroscopy* (espectroscopia de infrarrojo cercano) por sus siglas en inglés.

O₂: Oxígeno Diatómico

PETO₂: Presión Parcial de Oxígeno

PETCO₂: Presión Parcial del Dióxido de Carbono

ABREVIATURAS USADAS

RER: *Respiratory Exchange Ratio* (Resultado del Intercambio Respiratorio) por sus siglas en inglés.

RPM: Revoluciones por Minuto

SNC: Sistema Nervioso Central

u.a: Unidades Arbitrarias

UV₂: Segundo Umbral Ventilatorio

VCO₂: Producción de Dióxido de Carbono

VE/VO₂: Equivalente Ventilatorio para el Oxígeno.

VE/VCO₂: Equivalente Ventilatorio para el Dióxido de Carbono.

VO₂: Consumo de Oxígeno

VO_{2max}: Consumo Máximo de Oxígeno

VO_{2pico}: Consumo de Oxígeno Pico

W: Vatios

W_{max}: Vatios máximos

WADA: *World Antidoping Agency* (Agencia Mundial Antidopaje) por sus siglas en inglés.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Primera página del primer artículo científico relacionado con el efecto de la cafeína desde un laboratorio.	38
Figura 2. Molécula de cafeína en la izquierda, y molécula de adenosina en la derecha.	42
Figura 3. Moléculas de cafeína bloqueando los receptores de adenosina en el cerebro.	43
Figura 4. Diseño experimental de los estudios 1 y 2.	69
Figura 5. Saturación de oxígeno en el músculo durante un test incremental hasta la fatiga tras la ingesta de 3 mg/kg de cafeína o un placebo. Los datos son la media \pm DS para 13 individuos sanos y activos. (*) La cafeína es diferente comparado con el placebo $P < 0.05$.	72
Figura 6. Ventilación pulmonar, presión parcial de O_2 y captación de O_2 durante un test incremental hasta la fatiga tras la ingesta de 3 mg/kg de peso de cafeína o un placebo. Los datos son la media \pm DS para 13 individuos sanos y activos. (†) el valor máximo con cafeína es diferente del valor máximo con placebo en $P < 0.05$.	73
Figura 7. Potencia máxima (W/kg), potencia media (W/kg) y concentración de lactato en sangre (mmol/L) al final de la prueba Wingate 15-s con administración de cafeína (3mg/kg) o un placebo. (*) Cafeína diferente de la condición de placebo $P < 0.05$.	78
Figura 8. Línea temporal de la salida de energía (W/kg) y la saturación de oxígeno muscular (%) durante la prueba Wingate 15-s con la administración de cafeína (3mg/kg) o una condición de placebo. Los datos son la media y DS para 15 participante. (*) Cafeína diferente a la condición del placebo $P < 0.05$.	79
Figura 9. Diseño experimental del estudio 3.	84
Figura 10. Tasa de oxidación de grasas (A), tasa de oxidación de carbohidratos (B) y tasa de gasto de energía (C) durante 1 hora de ciclo a la intensidad que provoca la máxima oxidación de grasas (<i>Fatmax</i>) después de la ingestión de cafeína o del placebo. (*) Diferencias significativas entre la cafeína y el placebo $P < 0.05$.	86

- Figura 11.** Calificación perceptiva del esfuerzo (A), VO_2 (B) y frecuencia cardíaca (C) durante 1 hora de ciclo a la intensidad que provoca la máxima oxidación de la grasa (*Fatmax*) después de la ingestión de cafeína o placebo. (*) Diferencias significativas entre la cafeína o placebo $P < 0.05$. **87**
- Figura 12.** Protocolo experimental de los estudios 4,5,6 y 7. **91**
- Figura 13.** Potencia máxima de ciclo (W_{max}) obtenida durante una prueba de test incremental con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (intervalos de confianza de $\pm 90\%$) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm desviación estándar. Los datos se han normalizado con respecto a los valores obtenidos en el día 0 de cada tratamiento para proporcionar una mejor comparación del efecto ergogénico de la cafeína en las variables estudiadas. (*) Cafeína diferente al placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$. **95**
- Figura 14.** Consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) obtenido durante una prueba de test incremental con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (intervalos de confianza de $\pm 90\%$) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm desviación estándar. Los datos se han normalizado con respecto a los valores obtenidos en el día 0 de cada tratamiento para proporcionar una mejor comparación del efecto ergogénico de la cafeína en las variables estudiadas. (*) Cafeína diferente al placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$. **96**
- Figura 15.** Potencia máxima de ciclismo obtenida durante una versión adaptada de la prueba Wingate (sprint total de 15-s) con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. **105**
- Figura 16.** Potencia media de ciclismo obtenida durante una versión adaptada de la prueba Wingate (sprint total de 15-s) con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. **106**
- Figura 17.** Representación gráfica para la obtención del Umbral ventilatorio 2. **109**

Figura 18. Carga de trabajo (W) en el segundo umbral de ventilación (UV_2) durante una prueba de test incremental de ciclismo con la administración de 3mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra los tamaños de los efectos (intervalos de confianza del $\pm 95\%$) para todas las comparaciones de puntos temporales entre la cafeína y el placebo. Los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$) fueron etiquetados como: (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm DS. (*) La cafeína es diferente al placebo para el mismo punto de tiempo en $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento a $P < 0.05$. Nota: En los días 0 y 11, tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ningún tratamiento. **111**

Figura 19. Captación de oxígeno (VO_2) en el segundo umbral de ventilación (UV_2) durante una prueba de test incremental de ciclismo con la administración de 3mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra los tamaños de los efectos (intervalos de confianza del $\pm 95\%$) para todas las comparaciones de puntos temporales entre la cafeína y el placebo. Los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$) fueron etiquetados como: (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm DS. (*) La cafeína es diferente al placebo para el mismo punto de tiempo en $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento a $P < 0.05$. Nota: En los días 0 y 11, tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ningún tratamiento. **112**

Figura 20. Ritmo cardíaco en el segundo umbral de ventilación (UV_2) durante una prueba de test incremental de ciclismo con la administración de 3mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra los tamaños de los efectos (intervalos de confianza de $\pm 95\%$) para todas las comparaciones de puntos temporales entre la cafeína y el placebo. Los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$) fueron etiquetados como: (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm DS. (*) La cafeína es diferente al placebo para el mismo punto de tiempo en $P < 0,05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento a $P < 0.05$. Nota: En los días 0 y 11, tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ningún tratamiento. **113**

Figura 21. Presión arterial sistólica con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (\pm 95% de intervalos de confianza) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños del efecto con una posible probabilidad de diferencia (>25%): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. Los datos del panel inferior se presentan como media \pm DS. (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$. **117**

Figura 22. Presión arterial diastólica con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (\pm 95% de intervalos de confianza) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños del efecto con una posible probabilidad de diferencia (>25%): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. Los datos del panel inferior se presentan como media \pm DS. (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$. **118**

Figura 23. Calificaciones autoinformadas de nerviosismo con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (\pm 95% de intervalos de confianza) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños del efecto con una posible probabilidad de diferencia (>25%): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. Los datos del panel inferior se presentan como media \pm DS. (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0,05$. **119**

Figura 24. Calificaciones autoinformadas de vigor con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (\pm 95% de intervalos de confianza) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños del efecto con una posible probabilidad de diferencia (>25%): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. Los datos del panel inferior se presentan como media \pm DS. (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$. **120**

Figura 25. Gráficos de caja y bigote para los efectos ergogénicos de 3 mg/kg de cafeína en la potencia de la bicicleta durante una prueba de test incremental (panel superior) y durante una prueba Wingate 15-s (panel inferior). La cafeína se comparó con un placebo en ocho ocasiones diferentes y cada gráfico representa los resultados de estas ocho comparaciones de cafeína y placebo para cada participante. “Promedio” representa los valores medios de los 11 participantes. La cruz representa el valor medio, mientras que las líneas inferior, media y superior del recuadro representan el percentil 25, 50 y 75% para cada individuo. Los bigotes representan los valores más bajos y más altos (rango).

125

Figura 26. Gráficos de caja y bigote para los efectos de 3 mg/kg de cafeína en la presión arterial sistólica (panel superior) y diastólica (panel inferior) en reposo. La cafeína se comparó con un placebo en ocho ocasiones diferentes y cada gráfico representa los resultados de estas ocho comparaciones de cafeína y placebo para cada participante. “Promedio” representa los valores medios de los 11 participantes. La cruz representa el valor medio, mientras que las líneas inferior, media y superior del recuadro representan el percentil 25, 50 y 75% para cada individuo. Los bigotes representan los valores más bajos y altos (rango).

126

Figura 27. Relaciones entre el efecto ergogénico de la cafeína y la presión arterial sistólica (panel superior) y diastólica (panel inferior) El efecto ergogénico de la cafeína se obtuvo midiendo la potencia máxima de los ciclos durante una prueba de test incremental (W_{max}) y durante una prueba Wingate de 15- La cafeína se comparó con un placebo en 8 ocasiones diferentes y cada punto representa un promedio de estas 8 comparaciones de cafeína y placebo para cada participante.

127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Revista de publicación de los artículos de la Tesis Doctoral e índice de impacto en el momento de elaboración de la Tesis Doctoral.	64-65
Tabla 2. Esquema con las principales características metodológicas y principales resultados de los Estudios que conforman esta Tesis Doctoral.	66-67
Tabla 3. Variables cardiovasculares en reposo, y gasto de energía y sustratos oxidados durante 1 hora de ciclo a la intensidad que provoca la máxima oxidación de la grasa (<i>Fatmax</i>) tras la ingestión de cafeína o un placebo.	85
Tabla 4. Calificación de los principales efectos secundarios en las 24 horas posteriores a la ingestión de cafeína o un placebo.	88
Tabla 5. Ritmo cardíaco máximo (latidos/min) y ventilación pulmonar máxima (L/min) durante un test incremental hasta la fatiga volitiva (VO_{2max}) de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.	98-99
Tabla 6. Concentración de lactato en sangre (mmol/L) después de un test incremental hasta la fatiga volitiva (VO_{2max}) y después de una prueba Wingate 15-s (Wingate) con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.	100-101
Tabla 7. Sensaciones subjetivas de resistencia y esfuerzo (escalas de 1 a 10 puntos) después de una prueba de test incremental, y potencia muscular percibida después de una prueba Wingate de 15-s con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.	102-103
Tabla 8. Equivalente ventilatorio para el oxígeno (O_2) y para el dióxido de carbono (CO_2) en el segundo umbral ventilatorio (UV_2) durante una prueba de test incremental de ciclismo con la administración de 3mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos.	114
Tabla 9. Frecuencia cardíaca tras la ingestión de cafeína con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.	121
Tabla 10. Dolor de cabeza, malestar gastrointestinal (GI) y dolor muscular con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.	122
Tabla 11. Irritabilidad, insomnio y diuresis respondidos, medidos con una escala de 1 a 10 puntos, con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.	123





RESUMEN
ABSTRACT

La cafeína (trimentilxantina 1,3,7) es una sustancia psicoactiva que puede ser obtenida de forma natural en las hojas de té, cacao, café y yerba mate. Es una sustancia que socialmente está aceptada y se estima que es consumida por, al menos, el 90% de la población mundial. Desde una perspectiva deportiva, ha sido demostrado que la cafeína es utilizada por el 74% de los deportistas debido a sus efectos de mejora en el rendimiento deportivo, tanto en pruebas aeróbicas, como anaeróbicas. A pesar de la abundante información científica asociada a la ingesta aguda de cafeína y su ergogenicidad, falta información en la literatura científica sobre aspectos como la tolerancia o algunos mecanismos adicionales.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue evaluar y analizar los nuevos paradigmas (mecanismos adyacentes, oxidación de grasas asociadas a la intensidad y tiempo de tolerancia) sobre la ingesta de cafeína.

Para dar respuesta a este objetivo se plantearon 7 investigaciones con un diseño experimental de medidas repetidas, doble ciego y con orden aleatorizado. Esta metodología de investigación siempre fue comparada con una sustancia placebo. En total, 38 deportistas activos y sanos participaron en las investigaciones.

En el estudio 1 se investigó el efecto de 3 mg/kg de peso corporal de cafeína en la saturación de oxígeno de los músculos vastos laterales del cuádriceps durante un ejercicio con una intensidad incremental en un total de 13 participantes sanos y activos. La ingesta aguda de la cafeína mejoró el rendimiento aeróbico máximo, mientras que los cambios inducidos por la cafeína que se observan en la saturación de oxígeno de los músculos, la ventilación pulmonar y la acumulación de lactato en la sangre sugieren que esos mecanismos también podrían contribuir al efecto ergogénico de la cafeína.

El estudio 2 investigó el efecto de 3mg/kg de peso corporal de cafeína en la saturación de oxígeno de los músculos vastos laterales del cuádriceps durante un test anaeróbico de Wingate de 15-s en un total de 15 participantes activos y sanos. En

esta investigación, la cafeína aumentó la potencia pico, la potencia media y, en consecuencia, la concentración de lactato en la sangre. Sin embargo, la ingestión de cafeína no indujo diferencias en la saturación de oxígeno en comparación con el placebo. Estos resultados sugieren que la saturación de oxígeno no es un mecanismo que intervenga en el efecto ergogénico durante los esfuerzos anaeróbicos de corta duración.

En el estudio 3 de nuevo se utilizó 3mg/kg de peso corporal de cafeína para comprobar el efecto que tiene sobre la oxidación de los sustratos metabólicos de todo el cuerpo. Doce adultos sanos y activos pedalearon durante 1 hora en un cicloergómetro a la intensidad que provoca la máxima oxidación de la grasa (*Fatmax*). Estos resultados sugieren que la ingesta aguda de una dosis moderada de cafeína aumenta la cantidad de grasa oxidada durante 1 hora de ciclismo al *Fatmax*.

El estudio 4 investigó el tiempo de tolerancia a los efectos ergogénicos de una dosis moderada de cafeína (3mg/kg) en valores máximos de un test incremental y un test de Wingate de 15-s. Para ello 11 sujetos sanos y activos formaron parte de esta investigación. Los resultados muestran un efecto ergogénico continuado con la ingestión diaria de cafeína durante 15-18 días; sin embargo, los cambios en la magnitud de este efecto sugieren una tolerancia progresiva.

El estudio 5 investigó la evolución de la tolerancia al efecto ergogénico de una dosis moderada de cafeína (3 mg/kg) en el segundo umbral de ventilación en 11 sujetos sanos y activos. Hubo una atenuación progresiva del efecto ergogénico de la cafeína en la carga de trabajo alcanzada por el segundo umbral ventilatorio cuando la sustancia se ingiere crónicamente durante 20 días consecutivos. Por lo tanto, la habituación a la cafeína mediante la ingestión diaria puede reducir el efecto ergogénico de este estimulante en el ejercicio aeróbico de intensidad submáxima.

El estudio 6 investigó el tiempo de tolerancia a los efectos secundarios más comunes inducidos por la cafeína en 11 sujetos sanos y activos a través de una encuesta proporcionada diariamente. La ingesta diaria de 3mg/kg de cafeína indujo una elevación significativa de la presión arterial que desapareció después de 8 días. Sin embargo, otros efectos inducidos por la cafeína, como el aumento del nerviosismo y el vigor, la irritabilidad, el insomnio y la diuresis, permanecieron después de 20 días de ingestión consecutiva de cafeína.

Finalmente, en el estudio 7 se realizó un subanálisis de los estudios 5 6 y 7. Analiza el concepto de “*no respondedores*” a la cafeína. Los resultados amplían la sugerencia de una ocurrencia mínima de “*no respondedores*” porque muestra que todos los individuos respondieron a la cafeína cuando la sustancia es comparada con un placebo en varias pruebas.

ABSTRACT

Caffeine (trimethylxanthine 1,3,7) is a psychoactive substance that can be obtained naturally in tea leaves, cocoa, coffee and yerba mate. It is a socially accepted substance and is estimated to be consumed by at least 90% of the world's population. From a sports perspective, it has been demonstrated that caffeine is used by 74% of athletes due to its effects on improving sports performance, both in aerobic and anaerobic tests. Despite the abundant scientific information associated with acute caffeine intake and its ergogenicity, there is a lack of information in the scientific literature on aspects such as tolerance or additional mechanisms.

The main aim of this Doctoral Thesis was to evaluate and analyze new paradigms (adjacent mechanisms, fat oxidation associated with intensity and tolerance time) on caffeine intake.

In order to answer this, 7 investigations with repeated measures, double-blind and randomized order experimental design were proposed. This research methodology was always compared with a placebo substance. In total 38 healthy active athletes participated in the investigations.

In study 1, the effect of 3 mg/kg body weight of caffeine on the oxygen saturation of the lateral vastus quadriceps muscles during exercise with an incremental test to volitional fatigue was investigated. 13 healthy active participants took part in this investigation. Acute caffeine intake increased maximum aerobic performance, while caffeine-induced changes in muscle oxygen saturation, pulmonary ventilation and blood lactate concentration suggest that these mechanisms may also contribute to the ergogenic effect of caffeine.

Study 2 investigated the effect of 3 mg/kg body weight of caffeine on oxygen saturation on the lateral vastus quadriceps muscles during a 15-seconds Wingate anaerobic test. 15 healthy active participants performed this research. In this investigation, caffeine increased mean and peak power and consequently, blood lactate concentration. However, caffeine ingestion did not induce differences in oxygen saturation compared to placebo. These results suggest that oxygen saturation is not a mechanism involved in the ergogenic effect during short-duration anaerobic efforts.

Study 3 used 3 mg/kg body weight of caffeine to test its effect on the oxidation of whole-body metabolic substrates. Twelve healthy active adults cycled for 1 hour on a cycloergometer at the intensity that elicits maximum fat oxidation (*Fatmax*). These results suggest that acute intake of a moderate dose of caffeine increases the amount of fat oxidized during 1 hour of cycling at *Fatmax*.

Study 4 investigated the tolerance time to the ergogenic effects of a moderate dose of caffeine (3 mg/kg) at maximum values of an incremental test and a 15-s Wingate test. For this purpose, 11 healthy active subjects took part in this research. The results show a continued ergogenic effect with daily caffeine intake for 15-18 days. However, changes in the magnitude of this effect suggest a progressive tolerance.

Study 5 investigated the evolution of tolerance to the ergogenic effect of a moderate dose of caffeine (3 mg/kg) at the second ventilatory threshold in 11 healthy active subjects. There was a progressive attenuation of the ergogenic effect of caffeine on the workload reached by the second ventilatory threshold when the substance was chronically ingested for 20 consecutive days. Therefore, habituation to caffeine by daily ingestion may reduce the ergogenic effect of this stimulant in below maximum intensity aerobic exercise.

Study 6 investigated the tolerance time to the most common caffeine-induced adverse effects in 11 healthy active subjects through a survey provided daily. Daily intake of 3 mg/kg caffeine induced a significant increase of blood pressure that disappeared after 8 days. However, other caffeine-induced effects such as increased nervousness, irritability, insomnia and diuresis, remained after 20 days of consecutive caffeine intake.

Finally, a sub-analysis of studies 5, 6 and 7 was performed in study 7. It analyzes the concept of “non-responders” to caffeine. The results extend the suggestion of a minimal occurrence of “non-responders” because it shows that all individuals responded to caffeine when the substance is compared to a placebo in several tests.





**MARCO
TEÓRICO**

La cafeína a través de la historia en el deporte y la ciencia

La cafeína (trimentilxantina 1,3,7) es una droga psicoactiva obtenida de forma natural en las hojas de té, cacao, café y yerba mate. Sin embargo, también se puede sintetizar en laboratorios como componente de ciertos medicamentos, cosméticos, suplementos nutricionales y bebidas comerciales (Magkos & Kavouras, 2005). Es una sustancia que está socialmente aceptada y es consumida por, al menos, el 90% de la población mundial. El motivo de este gran uso por parte de la población es la gran accesibilidad que tiene en el mercado de alimentos y suplementos nutricionales, ya que se puede encontrar mercantilizados en muchos países. Por otro lado, como ventaja para su consumo, la cafeína no necesita ningún tipo de prescripción médica, y, en el caso del deporte, es una sustancia muy utilizada para la mejora del rendimiento, ya que existe mucha evidencia científica respecto a sus efectos ergogénicos (Burke, 2008).

Desde una perspectiva histórica, la cafeína en el mundo del deporte comenzó a ser usada principalmente por atletas olímpicos. Dado el efecto ergogénico a través de la estimulación del sistema nervioso central (SNC) (Delbeke & Debackere, 1984), y además, el gran abuso de la sustancia entre los atletas, la cafeína se incluyó en la lista de sustancias prohibidas por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA) en 1984 (Van Thuyne & Delbeke, 2006). Sin embargo, debido al difícil control y a la fácil accesibilidad en el mercado, la sustancia se permitió el 1 de enero del 2004 (Del Coso et al., 2011; Van Thuyne & Delbeke, 2006). De manera anecdótica, esta decisión no afectó al consumo habitual entre atletas, ya que fue detectado que su uso era similar a los años en los que la sustancia estaba declarada prohibida (Van Thuyne & Delbeke, 2006).

Un estudio que investigó la prevalencia del uso de la cafeína entre 2004 y 2008, demostró que el 74% de los atletas analizados mediante muestras de orina, consumían cafeína antes o durante la competición, siendo en deportistas de disciplinas de resistencia en los que se encontró mayor cantidad de cafeína (Del Coso et al., 2011). Apoyándose en estudios con datos más recientes, Aguilar-Navarro et al. (2019) mostraron que el consumo de cafeína entre atletas desde 2004 hasta 2015 continuó incrementado y estableciéndose como una gran estrategia ergogénica. Destacando el aumento de este consumo en deportistas de otras disciplinas deportivas de predominancia anaeróbica o mixta.

La ergogenicidad de la cafeína y su análisis en un laboratorio proviene desde 1907 con “*The action of caffeine on the capacity for muscular work*” (Rivers & Webber, 1907) Figura 1), lo que supuso el inicio de una gran línea de investigación a lo largo de los años. Una mini revisión realizada por Juan José Salinero et al., (2019), comunicaron que, hasta la fecha de la publicación, la información acerca de los sujetos analizados fue de 5321 personas. Además, destacó que tan solo el 16.3% de los participantes analizados fueron mujeres. Asimismo, una comunicación corta para la revista científica “*Nutrients*”, informó que en el año 2019, 202 manuscritos se centraron en el estudio de los efectos de la cafeína (67.8% cafeína, 32.2% café), de los cuales el 77.8% se objetivaron en el rendimiento deportivo (Del Coso et al., 2020).

**THE ACTION OF CAFFEINE ON THE CAPACITY
FOR MUSCULAR WORK. BY W. H. R. RIVERS AND
H. N. WEBBER.**

(From the Psychological Laboratory, Cambridge.)

THE research of which an account is to be given in this article differs in several respects from previous attempts to determine the influence of caffeine on the capacity for muscular work in man. The method which has been usually employed has been to take a continuous series of ergograms at intervals of two to five minutes and to administer the caffeine either before or at some stage in this continuous series. Such a method gives no adequate means for the determination of any differential action of the drug in the fresh condition and after fatigue has been produced by the performance of a certain amount of work. We have therefore tested the effect of the drug on the work recorded in sets of ergograms separated by intervals of rest so that we have been able to examine not only the influence of the drug at different intervals after its administration, but also its action at the beginning of, and throughout each set of ergograms.

In another important respect our work differs from all that previously recorded, in that on the normal or control days we have taken doses of a mixture which we were absolutely unable to distinguish from that containing the caffeine¹. In this way we have not only eliminated any possible influence of suggestion, but also the much more important sources of error arising from the sensory stimulation produced by swallowing the drug and from the interest due to the act of taking it.

Each experiment was prolonged over a number of days, on some of which a dose of caffeine was taken, and on others a dose of the control. Both the caffeine and control mixtures were in most cases prepared for us by Dr W. E. Dixon for whose kind help in this respect we are very greatly indebted.

¹ In experiments on the action of coffee, Schumberg (*Arch. f. physiol.* 1899, Suppl. S. 296) used a control coloured so as to resemble coffee, but there can have been no question here of a control wholly indistinguishable from the coffee.

Figura 1.

Primera página del primer artículo científico relacionado con el efecto de la cafeína desde un laboratorio.

Como conclusión, las investigaciones sobre la ingesta de cafeína, o sustancias que contienen cafeína, son muy recurrentes hoy en día, tanto a nivel social y salud, como a nivel deportivo, lo que la convierte en una sustancia de gran relevancia en el campo de la ciencia. Sin embargo, todavía existen vacíos en la ciencia para investigar los efectos de la cafeína en un amplio espectro de variables en lo que al rendimiento deportivo respecta.

La ergogenicidad de la cafeína

Actualmente, los artículos y meta-análisis publicados acerca de los efectos ergogénicos de la cafeína, han llegado a un nivel de publicación de *umbrella* (meta-análisis de meta-análisis (Grgic et al., 2019)). Tales evidencias meta-analíticas con respecto a la ergogenicidad de la cafeína, han reportado mejoras significativas en, al menos, un componente del rendimiento deportivo, informando de una magnitud del efecto de pequeño a moderado, siendo los efectos en pruebas aeróbicas superiores a pruebas anaeróbicas (Pickering & Grgic, 2019).

Dado la gran cantidad de publicaciones científicas relacionando la ingesta de cafeína y el rendimiento deportivo, entre estas, se centraron en la dosis-respuesta óptima. Aunque se ha estudiado los efectos ergogénicos en un amplio espectro de dosis, ha sido consensuado que las dosis moderadas de la cafeína (3-6 mg/kg) tienen un efecto ergogénico similar a las dosis más altas (Lawrence L. Spriet, 2014). Además, las dosis moderadas parecen no presentar efectos secundarios de gran magnitud. Por otro lado, una dosis de 3 mg/kg de peso es suficiente para incrementar la cantidad de oxidación de las grasas a intensidades moderadas (Collado-Mateo et al., 2020). Por lo tanto, una dosis moderada de cafeína es suficiente para mejorar el nivel deportivo, aunque cabe destacar, que la variabilidad inter-individual, podría condicionar el efecto de la sustancia.

Respecto al rendimiento aeróbico una ingesta aguda de cafeína (3-6 mg/kg) antes del ejercicio, tiene una magnitud del efecto en un rango de (0.22-0.61 *d*), reforzando las hipótesis de que la sustancia mejora el rendimiento aeróbico a través del retraso en el tiempo de fatiga (Mike Doherty & Smith, 2004) y el incremento del trabajo mecánico acumulado en pruebas de larga duración (Southward, Rutherford-Markwick, & Ali, 2018), la disminución del tiempo en completar una prueba como son los *time trial* (Ganio et al., 2009), mejorando la intensidad donde el deportista consigue el segundo umbral ventilatorio (Berry et al., 1991; McNaughton, 1987), o aumentando la oxidación de grasas durante el ejercicio para mayor disponibilidad del glucógeno muscular en los posibles minutos finales del ejercicio (Costill et al., 1978; T. E. Graham, 2001).

Por otro lado, los resultados tras una ingesta aguda de cafeína en la capacidad anaeróbica, ha generado controversias en pruebas específicas como el test anaeróbico Wingate. Algunas investigaciones reportaron efectos ergolíticos de la cafeína (disminución del rendimiento deportivo), sin embargo, otros investigadores evidenciaron efectos positivos (J. K. Davis & Green, 2009). Finalmente, un meta-análisis que específicamente analizó el test anaeróbico de Wingate relacionado con la ingesta aguda de cafeína, reportó que el efecto agudo de la sustancia, tanto en la potencia promedio como en la potencia pico, incrementó 3% y 4% respectivamente, aunque la magnitud del efecto fue pequeña en un rango de (0.18-0.27d) (Grgic, 2018b).

Por lo tanto, debido a que la evidencia científica acerca del efecto ergogénico de la cafeína tanto aeróbicas como anaeróbicas podría ser sólida. Quizás nuevos paradigmas tales como, el análisis de mecanismos subyacentes de la cafeína para el rendimiento, o bien el efecto de la ingesta crónica de una dosis baja de la sustancia, podrían ser aclarados para un mejor entendimiento de los efectos ergogénicos asociados a la sustancia.

Mecanismos asociados a la ingesta aguda y crónica de cafeína en humanos

El efecto de la cafeína sobre el rendimiento deportivo tiene asociados unos mecanismos directos sobre el SNC. Como se indicó anteriormente, existe un amplio consenso sobre la ingesta de 3-6 mg/kg de peso, 30-90 minutos antes de la práctica de ejercicio para conseguir un efecto ergogénico (Baltazar-Martins et al., 2019; Burke, 2008; Grgic et al., 2019; Muñoz et al., 2020; Pickering & Grgic, 2019; Salinero, Lara, & Del Coso, 2019). Este efecto se debe a la capacidad de retrasar la fatiga, suprimir el dolor, incrementar la liberación de neurotransmisores, y consecuentemente aumentar la ratio del impulso nervioso (Kalmar, 2005; Magkos & Kavouras, 2005; Nehlig et al., 1992). La influencia de la cafeína en el SNC se produce a través del bloqueo de los receptores de la adenosina en el cerebro A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 teniendo mayor afinidad con los receptores A_1 y A_{2A} (J. M. Davis et al., 2003; Glaister & Gissane, 2018). Específicamente, a pesar que este es el mecanismo principal, los efectos directos de la adenosina en los diferentes sistemas adyacentes son dependientes del tipo del receptor estimulado (Echeverri et al., 2010). La adenosina es una señalización endógena extracelular ubicua cuya concentración aumenta durante el ejercicio debido a la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP). Esta ejerce su efecto a través de la interacción con la proteína G acoplada a la membrana celular en todo el cuerpo, de los cuales están los 4 subtipos anteriormente escritos (Koupenova & Ravid, 2013; Layland et al., 2014).

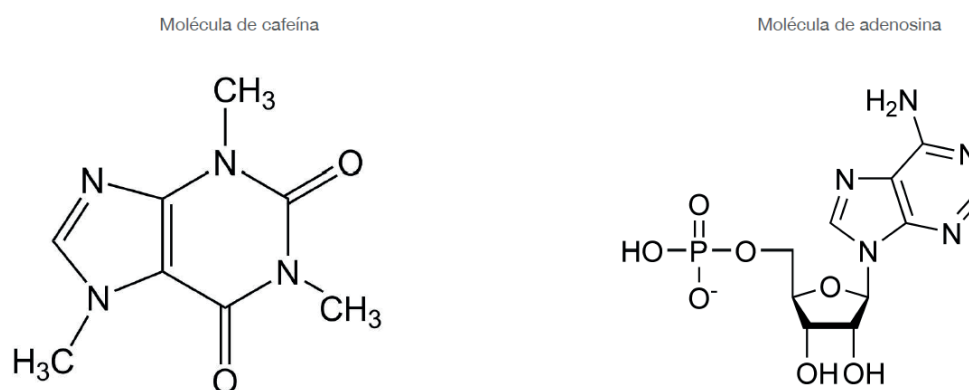


Figura 2.
Molécula de cafeína en la izquierda, y molécula de adenosina en la derecha.

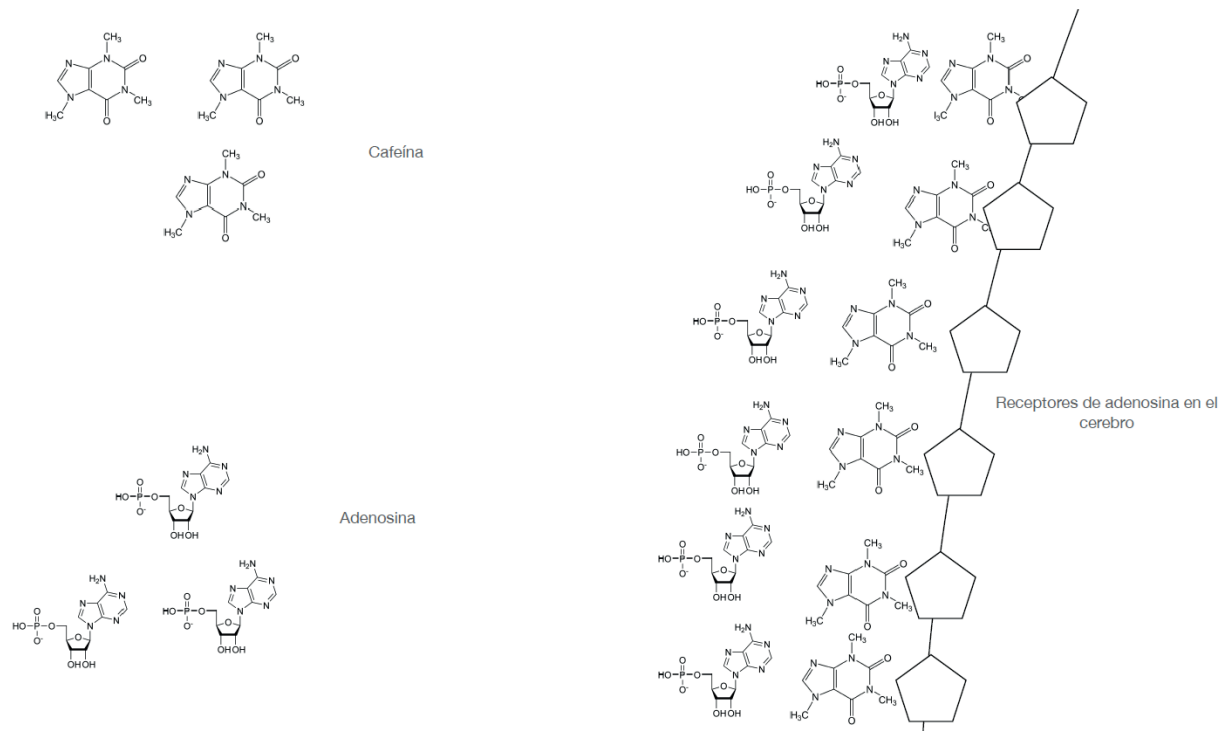


Figura 3.

Moléculas de cafeína bloqueando los receptores de adenosina en el cerebro.

A pesar de la influencia de la cafeína en el SNC, este mecanismo no puede ser aislado ya que existen otros mecanismos periféricos que pueden ayudar a que la ingesta de cafeína tenga mayor efecto ergogénico. Entre ellos, la cafeína también produce un aumento indirecto de la concentración de adenosina sérica al bloquear competitivamente los receptores de adenosina (Conlay et al., 1997). El aumento de la disponibilidad de adenosina provoca una estimulación generalizada de los quimiorreceptores distribuidos por toda la circulación, creando un aumento del tono simpático y la liberación de catecolaminas circulantes (Biaggioni et al., 1987). Estas hormonas podrían aumentar la liberación de ácidos grasos y la oxidación de las mismas, específicamente, mediante la segregación de epinefrina (Terry E. Graham et al., 2000a, 2008). Por otro lado, el principal efecto vascular de la adenosina se refleja induciendo una vasodilatación de diferentes vasos sanguíneos mediante la estimulación del receptor A_{2A} . Además, la administración aguda de cafeína aumenta la vasodilatación dependiente del endotelio mediante el aumento de la producción de óxido nítrico (Umemura et al., 2006). Así pues, la cafeína podría producir directa e indirectamente una vasodilatación en el endotelio y en las células del músculo

liso vascular, lo que provoca un aumento del flujo sanguíneo en los tejidos y del suministro de oxígeno al músculo que se ejercita durante el ejercicio (Umemura et al., 2006).

Aunque la evidencia en los mecanismos resultantes en el rendimiento deportivo parece bastante consensuada, todavía no está clara la incidencia de la ingesta crónica de cafeína y sus efectos, principalmente por la existencia de una tolerancia progresiva. Este fenómeno, en términos de rendimiento, ha sido analizado en animales reportando un aumento de los números de receptores de adenosina en la corteza cerebral. Así pues, esta sobre regulación evitaría el bloqueo de la cafeína manteniendo el efecto ergogénico motor por una ingesta continuada (Fredholm, 1979; Fredholm et al., 2017). Sin embargo, a nivel cardiovascular, debido a la afinidad que tiene la cafeína con los receptores α y β , y adicionalmente, a la capacidad de la sustancia en la liberación de catecolaminas se sugiere como principal factor para los efectos cardiovasculares. No obstante, mientras que a nivel motor existe una sobre regulación de los receptores de adenosina, los receptores α y β adrenérgicos son regulados mediante la disminución de los mismos, o no modificados (Fredholm et al., 1999; Shi et al., 1993), por lo tanto, el tiempo de tolerancia podría ser diferente.

Para la mejora del entendimiento de los efectos que tiene la cafeína para incrementar el rendimiento deportivo, es necesario incrementar la información añadiendo posibles mecanismos cooperadores que pudieran ser efectivos.

Cafeína, intensidad del ejercicio y oxidación de sustratos energéticos

El efecto cinético de la oxidación de grasas depende principalmente de la intensidad de ejercicio, aunque también existen otros factores tales como, sexo, nutrición (suplementación), o nivel de entrenamiento que pueden influir en la cantidad de grasas usadas como bioenergía (Amaro-Gahete et al., 2019; Maunder et al., 2018). Consecuentemente, la modulación en la oxidación de lípidos durante el ejercicio se produce a través de un rango de intensidades moderadas-bajas representado gráficamente una “U” invertida, en la cual existen dos variables principales representadas como:

- *Maximal fat oxidation* (MFO) máxima cantidad de grasas representadas en gramos al minuto (g/min).
- *Fatmax* la intensidad que se produce el MFO, puede ser medido en %VO_{2max}, frecuencia cardiaca (FC) latidos por minuto (LPM), Vatios (W) (Maunder et al., 2018).

Desde una perspectiva práctica, la manera más eficaz de maximizar la oxidación de las grasas durante el ejercicio submáximo es seleccionar la intensidad de ejercicio que produzca tasas máximas de oxidación de las grasas (Maunder et al., 2018) y mantener esta intensidad seleccionada a lo largo del tiempo (Gutiérrez-Hellín et al., 2020). De manera habitual, la oxidación de la grasa se maximiza a una intensidad de ejercicio moderada, en la que la mayor parte de las demandas de energía pueden ser cubiertas satisfactoriamente por el uso de los lípidos como bioenergía (Gutiérrez-Hellín et al., 2020). Por lo tanto, es interesante destacar la búsqueda de ayudas que puedan maximizar la oxidación de grasas. Estas ayudas, entre otras, pueden ser la *p*-sinefrina, las cetonas, ginseng, capsaicina, carnitina y la cafeína, las cuales están en constante investigación (Gutiérrez-Hellín & Del Coso, 2018; Jeukendrup & Randell, 2011; Kim et al., 2016).

Tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, la ingesta de cafeína aumenta la liberación de ácidos grasos y glicerol en el torrente sanguíneo a través de la segregación de catecolaminas. Por el contrario, la capacidad de la cafeína para cambiar la oxidación del sustrato durante el ejercicio de resistencia de intensidad submáxima es quizás el efecto que causa más controversia. En un primer momento

fue el principal hallazgo de investigaciones fundamentales sobre este tema (Costill et al., 1978). Sin embargo, desde entonces, se han publicado resultados contradictorios a favor o en contra de la eficacia de la cafeína para aumentar la oxidación de las grasas durante el ejercicio. Uno de los motivos de esta controversia puede ser debida a la utilización de diferentes protocolos. A este respecto, el aumento del rendimiento en el ejercicio inducido por la cafeína puede contrarrestar el efecto de la cafeína en la oxidación de los sustratos, ya que la intensidad del ejercicio es el principal modulador del uso de grasas y carbohidratos (CHO) durante el ejercicio de resistencia (Venables et al., 2005).

Mientras que existen investigaciones que han determinado que la ingesta aguda de una dosis moderada no modifica la oxidación de grasas durante el ejercicio (R. E. Beaumont & James, 2017; Terry E. Graham et al., 2000b, 2008; Hodgson et al., 2013). Otras investigaciones, han demostrado que la ingesta de cafeína previa al ejercicio incrementaba la tasa de oxidación de grasas con una intensidad moderada y con dosis similares (Alkhatib et al., 2015; Anderson & Hickey, 1994; Cruz et al., 2015; Donnelly & McNaughton, 1992; Ryu et al., 2001; Schubert et al., 2014). Sin embargo, la disparidad de los resultados, y las diferentes metodologías usadas son resultantes de conclusiones equivocadas. La divergencia de los resultados de estas investigaciones podría estar asociada a los protocolos experimentales utilizados para probar el efecto de la cafeína en la oxidación de los sustratos acompañado con otras variables. Así pues, es necesario una metodología de investigación donde fijar la intensidad al *fatmax* para analizar la modulación de los sustratos energéticos.

Ingesta crónica de cafeína y efectos en el rendimiento físico

Dado el efecto positivo en el rendimiento deportivo de la ingesta de cafeína, el uso regular de la sustancia es un tema bastante debatido a nivel científico. Las primeras investigaciones respecto a la ingesta crónica se centraron en animales, reportando una habituación progresiva ante la exposición de estos a una ingesta diaria (Fredholm, 1979) sugiriendo una progresiva tolerancia debido a la reducción de la magnitud del efecto. En humanos, al comparar la respuesta ergogénica a la cafeína de las personas con un consumo diario bajo o nulo, con aquellas habituadas a la sustancia, la respuesta de éstas últimas presentan una magnitud similar a la de sus homólogos no habituados (Dodd et al., 1991; Gonçalves et al., 2017; Grgic & Mikulic, 2020). Aunque este hallazgo contradice la existencia de tolerancia al efecto ergogénico de la cafeína, las personas no habituadas responden mejor a la cafeína que las personas habituadas (Bell & McLellan, 2002), mientras que las personas con un alto consumo crónico de cafeína obtienen pocos beneficios de este estimulante incluso después de utilizar altas dosis (Wilk et al., 2019). Es importante destacar que el umbral utilizado para clasificar a las personas como habituadas o no habituadas a la cafeína varía mucho entre las distintas investigaciones (Filip et al., 2020), lo que dificulta la obtención de conclusiones definitivas de estas investigaciones transversales.

Respecto a las diversas metodologías utilizadas para el análisis del efecto de la cafeína tras una ingesta diaria, se han encontrado disparidad de protocolos y resultados. Por ejemplo, nos encontramos con una investigación de R. Beaumont et al., (2017) en la cual administraron cafeína en dosis de 1,5 a 3 mg/kg/día en un grupo de consumidores de poca cafeína. El tiempo de ingesta fue de 28 días consecutivos y se los comparó con individuos que recibieron un placebo durante el mismo período. Como principales resultados, encontraron que los individuos del grupo con ingesta de cafeína demostraron un menor efecto ergogénico de la suplementación con cafeína aguda después del tratamiento de 28 días. Sin embargo, los individuos del grupo de control seguían respondiendo a la ingesta de cafeína después del tratamiento. Esta investigación representó el primer diseño experimental que utilizó la administración continuada de cafeína para inducir una habituación estandarizada a la cafeína entre los individuos.

Una de las limitaciones para comprobar el efecto ergogénico de la ingesta continuada de cafeína es la comparación posterior a la administración de suplementos entre los ensayos de cafeína y de placebo haciendo imposible determinar entre los efectos de la tolerancia y los efectos del entrenamiento durante el tratamiento de 28 días. Finalmente, con los datos combinados de investigaciones anteriores (R. Beaumont et al., 2017; Stadheim et al., 2014) sugieren que la habituación al efecto ergogénico de la cafeína podría producirse a lo largo del tiempo con una ingesta continuada.

Dado este *background*, se desconoce concretamente el tiempo concreto en que la ingesta diaria de cafeína de dosis bajas podría perder la magnitud del efecto, tanto al rendimiento aeróbico máximo (VO_{2max} , vatios, concentración de lactato, frecuencia cardiaca percepción del esfuerzo), submáximo (variables respecto al segundo umbral ventilatorio) y rendimiento anaeróbico (test anaeróbico de Wingate modificado en 15 segundos). Por lo tanto, esta Tesis Doctoral podría dar información acerca de los beneficios de la cafeína en el rendimiento deportivo tras una ingesta crónica, complementándolo con un diseño de investigación estandarizada, controlada y cruzada.

Efectos secundarios y adversos asociados a la ingesta de cafeína aguda y crónica

El consumo de cafeína, tanto agudo como continuo, ha sido asociado a diversos efectos adversos. Por un lado, existe la ingesta de cafeína a través de bebidas energéticas con gran contenido de cafeína mezclado con otras sustancias neuroexcitadoras, siendo esta, quizás, la principal motivación por el sujeto de consumir cafeína. Y por otro lado, la ingesta regular de café, la principal fuente de consumo de cafeína en las sociedades modernas. Esta ingesta se ha asociado con beneficios adicionales sobre el estado de salud, como la disminución del riesgo de varios cánceres, las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de Parkinson y la diabetes de tipo 2 (Grosso et al., 2017). Sin embargo, la ingesta de una dosis moderada de cafeína también se ha asociado con varios efectos negativos como el aumento de la ansiedad, el insomnio, el malestar gastrointestinal y, en particular, el aumento de la presión arterial en reposo (Wikoff et al., 2017). La magnitud y la duración de estos inconvenientes dependen de la dosis y podrían presentar cierta variabilidad interindividual debido a la genética (Wikoff et al., 2017).

Cabe destacar que la mayoría de las investigaciones muestran que el consumo habitual de cafeína no aumenta el riesgo de valores elevados de presión arterial (Guesous et al., 2014; Zhang et al., 2011) porque la tolerancia a los efectos cardiovasculares de la cafeína se desarrolla con el tiempo (Robertson et al., 1981). De acuerdo con este hallazgo, la tolerancia a los efectos secundarios en las variables hemodinámicas, tanto positivos como negativos asociados a la ingesta de cafeína, se han identificado mediante experimentos transversales que compararon a los consumidores habituales de cafeína con los consumidores esporádicos (Bell & McLellan, 2002; Corti et al., 2002; Vera et al., 2019). Sin embargo, también hay pruebas que ponen en duda la existencia de la tolerancia a los efectos de la cafeína (Childs & De Wit, 2006; Gonçalves et al., 2017; Kennedy & Haskell, 2011; Watson et al., 2002). La falta de consenso entre estas investigaciones podría deberse a las diferencias en los métodos utilizados para categorizar el consumo de cafeína, la duración diversa de los protocolos utilizados para inducir la tolerancia y las diferencias en la dosis de cafeína administrada/analizada (Vera et al., 2019). No obstante, las diferencias en los mecanismos de los efectos secundarios positivos y negativos inducidos por la cafeína también podrían explicar la incoherencia en lo que respecta a la tolerancia a los efectos de la cafeína.

Respondedores vs. no respondedores a la ingesta de cafeína

Otro de los temas de actualidad referentes a la ingesta de cafeína es la capacidad de respuesta individual a la ingesta de la sustancia. Del Coso et al., (2020) han mostrado que un total de 202 artículos relacionados con la ingesta de la cafeína o de café contenían resultados dispares para la salud y para el rendimiento deportivo. Estos resultados pueden ser causa de la gran variabilidad a la respuesta ergogénica de la ingesta de la cafeína entre participantes. Existen un gran número de revisiones científicas que avalan esta hipótesis (Fulton et al., 2018; Grgic, 2018a; Southward, Rutherford-Markwick, Badenhorst, et al., 2018).

Dada la evidencia meta-analítica asociada a los efectos ergogénicos de la cafeína, ha sido determinado una gran variedad de respuesta a múltiples de la misma en lo que el rendimiento deportivo respecta. Sin embargo, un número limitado de investigaciones han expuesto que la ingesta aguda de cafeína podría variar mucho entre las respuestas individuales de los consumidores ((Jenkins et al., 2008; Lara et al., 2015) y también en la metodología de las investigaciones (Grgic, 2018a)).

Es importante destacar que utilizando un mismo protocolo experimental aleatorizado en los que la ingesta de una dosis moderada de cafeína (1-6 mg/kg) se compara con una condición de placebo en un grupo de individuos, no todos obtienen los mismos resultados. A pesar de que la cafeína produjo un aumento del rendimiento físico como media del grupo, uno o varios individuos obtuvieron efectos ergogénicos mínimos o incluso ligeramente ergolíticos después de la ingestión de cafeína. Estos individuos suelen ser categorizados científicamente como no respondedores a los efectos ergogénicos de la cafeína (Salinero et al., 2017). Una de las causas de la falta de una respuesta física positiva a la cafeína se han asociado a factores genéticos (polimorfismos CYP1A2 y ADORA2A) y ambientales, como la tolerancia desarrollada por un uso crónico de la cafeína, el momento, la dosis inapropiada en la administración o el estado de entrenamiento (Pickering & Kiely, 2018).

Recientemente, Pickering & Kiely, (2018) y Grgic (2018a) han puesto en duda el concepto de no respondedor a la cafeína, porque esta noción se basa principalmente en investigaciones basadas en la medición de una variable de rendimiento obtenida una vez. Esta metodología experimental para evaluar las respuestas individuales a

la ingestión de cafeína podría producir errores porque un individuo no siempre responde a la cafeína en la misma medida en todas las pruebas (Grgic & Mikulic, 2017, 2020). Además, el coeficiente de variación de las pruebas de esfuerzo utilizadas para evaluar el rendimiento podría ser otra fuente de error (Grgic, 2018a). Estos autores además coinciden en sugerir que la correcta identificación del efecto ergogénico individual inducido por la ingesta de cafeína requiere la medición repetida del rendimiento físico en comparaciones idénticas de cafeína y placebo. Como sugiere Grgic, (2018a), se puede seleccionar una de las siguientes opciones para evaluar el efecto ergogénico individual inducido por la cafeína: (1) múltiples pruebas de ejercicio con la misma dosis de cafeína o, (2) múltiples dosis de cafeína con la misma prueba de ejercicio o, (3) utilizando un protocolo más complejo que combina evaluaciones repetidas del rendimiento físico en días diferentes utilizando la misma prueba de ejercicio y la misma dosis de cafeína. De ser así, la mayoría de las investigaciones anteriores sobre el estudio de las respuestas individuales a los efectos ergogénicos de la cafeína podrían no ser metodológicamente correctas porque la categorización se ha basado principalmente en una comparación entre la cafeína y el placebo.

Por lo tanto, debido a la gran disparidad en las respuestas individuales, y para reforzar los conocimientos acerca de la variabilidad a la respuesta ergogénica de la cafeína, es necesario una metodología de medidas repetidas, y su consecuente monitorización intrasujeto.





OBJETIVOS

OBJETIVOS

Atendiendo a la temática presentada, el objetivo principal de esta tesis doctoral es evaluar y analizar los diferentes paradigmas (mecanismos adyacentes, oxidación de grasas asociadas a la intensidad y tiempo de tolerancia) respecto a la a ingesta de cafeína. Con el propósito de adaptar los resultados a las diferentes aplicaciones prácticas que existen detrás de una ingesta controlada de la sustancia, además ofrecer nuevas líneas de investigación para futuros estudios. Como objetivos secundarios podemos determinar:

- Investigar los efectos agudos de la cafeína en la saturación de hemoglobina en el vasto lateral durante un test incremental y un test de Wingate de 15-s.
- Investigar los efectos de una ingesta aguda de 3 mg/kg de peso de cafeína en la modulación de la oxidación de sustratos energéticos a intensidades tolerables intensidad (*Fatmax*)
- Determinar el tiempo de tolerancia de la capacidad ergogénica de la cafeína en las variables máximas y submaximas de un test incremental (umbral ventilatorio 2), y las máximas de un test de Wingate de 15-s. Además, describir la evolución de los cambios inducidos por la cafeína en la presión arterial en reposo, la frecuencia cardíaca y la magnitud de los efectos secundarios típicamente asociados con la ingesta de cafeína y el deporte.
- Desmitificar la figura de respondedor o no respondedor a la cafeína mediante una metodología de medidas repetidas.

ACETYLCHOLINESTERASE
ANIMAL
XANTHINE
SYNTHESIZED
HYDROUS
SIGNIFICANT
PSYCHO
KOLA
TART
SOURCE
PREGNANCY
RECEPTORS
ACETYLCHOLINE
INHIBITOR
CENTRAL
GLYCEROL
CONSUMPTION
DECAFFEINATION
PROPERTIES
FOUND
DIPOLYSIS
SYSTEM
AMINO
ACID
EXTRACT
POLYMER
RACEMIC
CELLULOSE
ACETYLCHOLINE
SYNTHESIS
HIGH
BIOSYNTHESIS
EXTRACTION
SYMPTOM
MSTABLET
BRONCHOPULMONARY
CHOCOLATE
NUCLEOTIDES
THEOPHYLLINE
ACETYLCHOLINE
SYNTHESIS
MILLIGRAMS
MILLILITRES
METABOLITES
WATER
NEONATES
EQUIVOCAL
CONTENT
BLOOD
GLIANT
PARALYZES
COCOA
ACHILLOTE
NERVOUS
PESTICIDE
ADENOSINE
VASODILATOR
ENERGY
SEEDLINGS
YERBALIVER
PERSONAL
WIDELY
TOLERANCE
CUP
SOLVENT
RABDOMYOLYSIS
HOUR
BEVERAGE
STUDIES
METABOLISM
GANGLIAN
BLOOD
BEAN
TART
PREGNANCY
RECEPTORS
ACETYLCHOLINE
INHIBITOR
CENTRAL
GLYCEROL
CONSUMPTION
DECAFFEINATION
PROPERTIES
FOUND
DIPOLYSIS
SYSTEM
AMINO
ACID
EXTRACT
POLYMER
RACEMIC
CELLULOSE
ACETYLCHOLINE
SYNTHESIS
HIGH
BIOSYNTHESIS
EXTRACTION
SYMPTOM
MSTABLET
BRONCHOPULMONARY
CHOCOLATE
NUCLEOTIDES
THEOPHYLLINE
ACETYLCHOLINE
SYNTHESIS
MILLIGRAMS
MILLILITRES
METABOLITES
WATER
NEONATES
EQUIVOCAL
CONTENT
BLOOD
GLIANT
PARALYZES
COCOA
ACHILLOTE
NERVOUS
PESTICIDE
ADENOSINE
VASODILATOR
ENERGY
SEEDLINGS
YERBALIVER
PERSONAL
WIDELY
TOLERANCE
CUP
SOLVENT
RABDOMYOLYSIS
HOUR
BEVERAGE
STUDIES
METABOLISM
GANGLIAN
BLOOD
BEAN
TART
PREGNANCY
RECEPTORS

ION
CAFFEINATED
ULAR
VOXAMINE
LMONARY

MLLITERS
TMENT
RIDE
EFFECT
OLIC

MODERATE

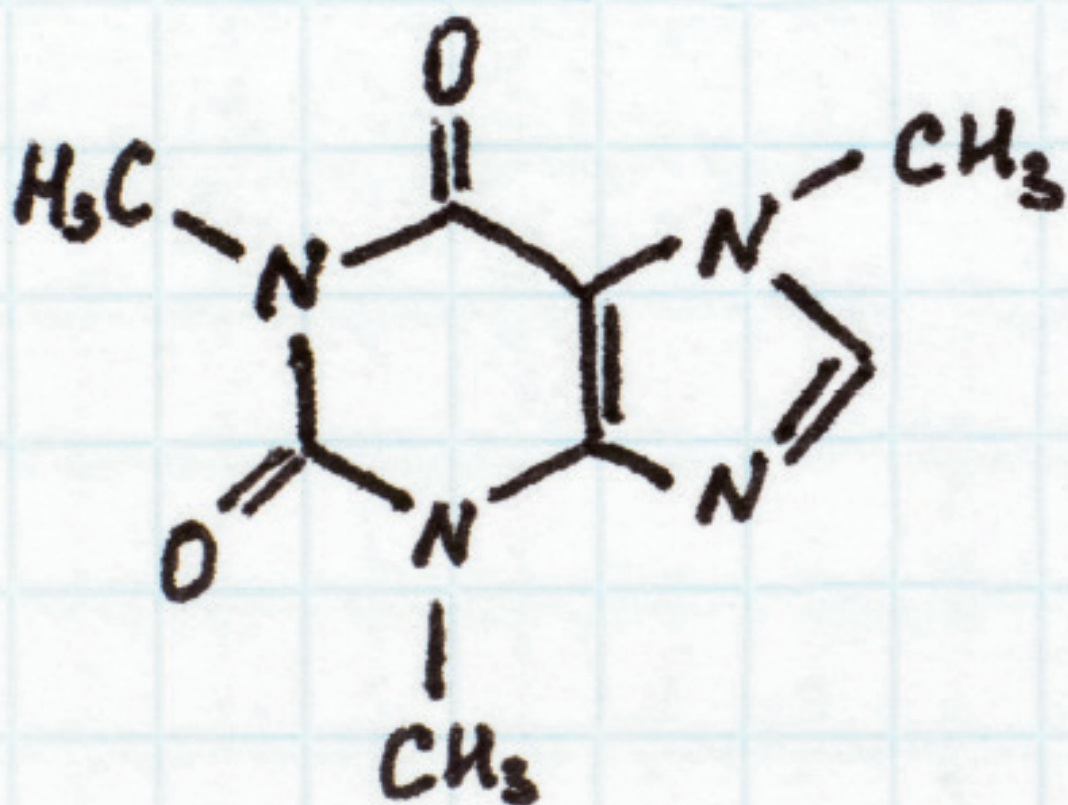
HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Dada la información introducida, y para cumplir los objetivos anteriormente descritos, se plantean las siguientes hipótesis de partida:

- El aporte de oxígeno local en la musculatura implicada en el ciclismo es un mecanismo fisiológico detrás de una ingesta aguda de 3mg/kg de peso de cafeína que puede ayudar a mejorar el rendimiento tras una ingesta de cafeína durante un test incremental. Sin embargo, este mecanismo no ayuda a mejorar el rendimiento durante un test anaeróbico de Wingate de 15-s.
- La ingesta aguda de 3mg/kg de peso de cafeína incrementará la oxidación de grasas en todo el cuerpo respecto a una condición de placebo durante 1 hora de ciclismo a la intensidad que maximiza la oxidación de grasas.
- La magnitud de los efectos ergogénicos de la cafeína durante una ingesta de 3 mg/kg/día, durante 20 días, en las capacidades máximas aeróbicas, anaeróbicas y submáximas, encontrarán su efecto agudo el primer día de ingesta, pero desaparecen de manera progresiva durante el curso del tiempo.
- La magnitud de los efectos adversos tras una ingesta de 3mg/kg/día, durante 20 días desaparecen de manera progresiva.
- Existen adicionales figuras respecto a la variabilidad interindividual de consumidores de cafeína, refutando la categorización de los no respondedores a la cafeína.

Caffeine





INVESTIGACIONES

INVESTIGACIONES

La presente Tesis Doctoral está compuesta por siete investigaciones experimentales llevadas a cabo por el doctorando junto al grupo de investigación del Laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Universidad Camilo José Cela (Madrid). Todas ellas se pueden calificar como “investigaciones de laboratorio” llevadas a cabo en condiciones controladas.

Los siete estudios de investigación experimentales planteados en esta tesis doctoral han sido diseñados mediante protocolos controlados con placebo siendo una metodología doble ciego, cruzado y aleatorizado.

Como resultado, han sido publicados 6 artículos científicos en revistas con factor de impacto en el Journal Citation Reports (JCR). Un artículo ha sido publicado en revistas especializadas en farmacología, (British Journal of Clinical Pharmacology), 3 artículos han sido publicados en revistas especializadas en la temática de nutrición (European Journal of Nutrition y Nutrients). Y finalmente otros 2 artículos han sido publicados en revistas enfocadas a la biología (Life, MDPI), y las ciencias multidisciplinares (Plos one). Uno de los artículos está bajo revisión. A continuación, se presentan un breve resumen, junto con la información de publicación y el factor de impacto JCR (Tabla 1). En la tabla 2, se pueden observar el resumen de las características metodológicas, así como el número de participantes en cada investigación, las variables medidas y los principales hallazgos encontrados. Se puede consultar una copia completa de cada artículo en los anexos de la presente Tesis Doctoral

Tabla 1. Revista de publicación de los artículos de la Tesis Doctoral e índice de impacto en el momento de elaboración de la Tesis Doctoral.

ESTUDIO	TÍTULO
Estudio 1	Carlos Ruiz Moreno; Beatriz Lara López; Diego Brito de Souza; Jorge Gutiérrez Hellín; Blanca Romero Moraleda; Ángel Cuellar Rayo; Juan del Coso Garrigós. Acute caffeine intake increases muscle oxygen saturation during a maximal incremental exercise test. British Journal of Clinical Pharmacology
Estudio 2	Carlos Ruiz Moreno; Jorge Gutiérrez-Hellín; Beatriz Lara López; Juan del Coso Garrigós. Acute caffeine intake does not modify muscle oxygen saturation during the 15 Wingate test. No publicado
Estudio 3	Carlos Ruiz Moreno; Jorge Gutiérrez-Hellín; Verónica Giráldez Costas; Jaime González García; Francisco Amaro-Gahete and Juan del Coso Garrigós. Caffeine increases whole-body oxidation during 1-h of cycling at Fatmax. European Journal of Nutrition.
Estudio 4	Beatriz Lara López; Carlos Ruiz Moreno; Juan José Salinero Martín; Juan del Coso Garrigós. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. PlosOne.
Estudio 5	Carlos Ruiz Moreno; Jorge Gutierrez-Hellín; Jaime González García; Beatriz Lara López; Juan del Coso Garrigós. Time course and magnitude of tolerance to the ergogenic effect of caffeine on the second ventilatory threshold. Life, MDPI
Estudio 6	Carlos Ruiz Moreno; Juan José Salinero Martín; Beatriz Lara López; Juan del Coso Garrigós. Time course of tolerance to adverse effects associated with the ingestion of a moderate dose of caffeine. European Journal of Nutrition.
Estudio 7	Beatriz Lara López; Carlos Ruiz Moreno; Juan José Salinero Martín; Juan del Coso Garrigós. Challenging the Myth of Non-Response to the Ergogenic Effects of Caffeine Ingestion on Exercise Performance. Nutrients, MDPI

FACTOR DE IMPACTO JCR CUARTILES ÁREA DE CONOCIMIENTO

3.740

Q2

Farmacología

Bajo revision

4.664

Q1

Nutrición y dietética

2.740

Q2

Ciencias multidisciplinares

2.991

Q2

Bioquímica general o biología

4.664

Q1

Farmacología

4.546

Q1

Nutrición y dietética

TOTAL 23.345

Tabla 2. Esquema con las principales características metodológicas y principales resultados de los Estudios que conforman esta Tesis Doctoral.

	ESTUDIO 1	ESTUDIO 2	ESTUDIO 3
Diseño	Estudio experimental, doble ciego, aleatorizado. Controlado por placebo y cruzado.	Estudio experimental, doble ciego, aleatorizado. Controlado por placebo y cruzado.	Estudio experimental doble ciego, aleatorizado controlado por placebo y balanceado.
Participantes	13 sujetos sanos y activos.	15 sujetos sanos y activos.	12 sujetos sanos y activos.
Dosis	3 mg/kg cafeína.	3 mg/kg cafeína.	3 mg/kg cafeína
VARIABLES dependientes	Saturación de oxígeno, consumo de oxígeno, presión parcial de oxígeno, ventilaciones.	Potencia pico, potencia promedio, saturación de oxígeno, concentración de lactato en sangre.	Oxidación de grasas, oxidación de CHO, consumo de energía y FC, y efectos secundarios.
Protocolo deportivo	Test incremental en cicloergómetro.	Test anaeróbico de Wingate durante 15- s.	60 minutos de ciclismo a la intensidad <i>Fatmax</i> .
Análisis estadístico	Prueba t, Anova de dos vías de medidas repetidas, corrección Geisser-Greenhouse, post-joc Tukey.	Prueba t, Anova medidas repetidas, corrección Geissergreenhouse, HSD posthoc Tuckey.	Prueba t, Anova de una y dos vías, post-hoc LSD, tamaño del efecto de Cohen (90%IC).
Principales resultados	La cafeína mejoro el rendimiento, e indujo mayor saturación de oxígeno en cargas medias respecto al VO_{2pico} , además no modificó variables respiratorias.	La ingesta aguda de cafeína mejoró la potencia promedio y pico, sin embargo, no modificó la saturación de oxígeno muscular.	La ingesta aguda cafeína aumentó el consumo de grasas total en comparación con el placebo sin afectar al gasto energético ni a la FC. El consumo de CHO se redujo tras la ingesta de cafeína.

ESTUDIO 4	ESTUDIO 5	ESTUDIO 6	ESTUDIO 7
Estudio experimental, doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo y cruzado.	Estudio experimental, doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo y cruzado.	Estudio experimental, doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo y cruzado.	Estudio experimental, doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo y cruzado.
11 sujetos sanos y activos.	11 sujetos sanos y activos.	11 sujetos sanos y activos.	11 sujetos sanos y activos.
3 mg/kg/día cafeína	3 mg/kg/día cafeína.	3 mg/kg/día cafeína.	3 mg/kg/día cafeína.
VO _{2max} , vatios máximos, Potencia pico y promedio en el Wingate durante 15-s.	VO ₂ , frecuencia cardiaca, vatios, equivalentes ventilatorios respecto al segundo umbral ventilatorio.	Presión arterial y frecuencia cardiaca en reposo, efectos secundarios asociados a la ingesta de cafeína.	Respuestas individuales de 11 sujetos durante 9 días en el Wingate y la presión arterial.
Test incremental en cicloergómetro, y test anaeróbico Wingate de 15-s.	Test incremental en cicloergómetro.	Realización de encuesta.	Test incrementales, test anaeróbico Wingate de 15-s. toma de presión arterial.
Anova de dos vías de medidas repetidas, post-hoc Tukey, tamaño del efecto de Cohen (90%IC)	Anova de dos vías de medidas repetidas, post-hoc Tukey, tamaño del efecto de Cohen (90%IC).	Anova de dos vías, post-hoc Tuckey, tamaño del efecto de Cohen (95%IC).	Subanálisis individual de los resultados de los sujetos del estudio 5,6,7. Presentado mediante una correlación de Pearson.
La ingesta de 3mg/kg/día de cafeína sugiere efectos ergogénicos diarios, sin embargo, los efectos acaban desapareciendo entre los 15-18 días de ingesta continuada.	La ingesta de 3 mg/kg/día de cafeína sugiere que, de el primer día de ingesta, se produce la magnitud más grande del efecto, mientras que en una ingesta continuada induce una tolerancia disminuyendo el efecto ergogénico en el UV ₂ .	La ingesta de 3mg/kg/día aumenta la presión arterial durante 8 días de ingesta continuada. Sin embargo, presenta asociados efectos secundarios como: nerviosismo, vigor, irritabilidad, insomnio.	Los resultados en esta tesis sugieren que las personas con una alta respuesta a los efectos cardiovasculares de la cafeína serían menos propensas a obtener beneficios ergogénicos de este estimulante.

ESTUDIO 1: LA INGESTA AGUDA DE CAFEÍNA AUMENTA LA SATURACIÓN DE OXÍGENO DEL MÚSCULO DURANTE UNA PRUEBA DE EJERCICIO DE INCREMENTO MÁXIMO

Objetivos

El objetivo de la presente investigación fue analizar los efectos de la cafeína en la saturación de oxígeno del vasto lateral externo durante un test incremental en un cicloergómetro.

Material y métodos

Participantes. Trece personas sanas y activas (6 hombres y 7 mujeres) (>4 días de entrenamiento por semana; >45 min. por día) se ofrecieron como voluntarias para participar en esta investigación. La edad media de los participantes \pm DS (desviación estándar) fue de 32.5 ± 6.5 años, una altura de 171 ± 8 cm, un peso de 65.2 ± 11.4 kg, y un consumo de oxígeno ($VO_{2\text{pico}}$) de 49.7 ± 8.5 mL/kg/min. En la muestra había siete mujeres que participaron en todo el experimento en su fase lútea. Todos los participantes eran poco consumidores de cafeína (< 50 mg de cafeína por día), no fumadores, y no informaron de ningún antecedente de enfermedades cardiopulmonares ni de lesiones musculoesqueléticas en los tres meses anteriores. Una semana antes del estudio, se informó a los participantes de los procedimientos experimentales y dieron su consentimiento informado por escrito para participar en la investigación. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Camilo José Cela.

Diseño experimental. En este estudio se utilizó un diseño experimental aleatorio, doble ciego, controlado por placebo y cruzado. Cada participante participó en 2 ensayos idénticos que se realizaron con 48 horas de diferencia para dar tiempo a la recuperación y eliminación de la cafeína. Los participantes fueron asignados aleatoriamente para ingerir una cápsula no identificable, ya sea llena de 3 mg de cafeína por kg de masa corporal (Bulk Powders, Reino Unido) o con la misma cantidad de celulosa como placebo (Guinama, España). La cápsula asignada para cada ensayo se administró con 150 mL de agua 60 minutos antes del comienzo de los ensayos experimentales. Cada prueba consistió en un test de ejercicio máximo graduado en un cicloergómetro (SNT Medical, Cardgirus, España) hasta la fatiga volitiva. Las variables ventilatorias, el ritmo cardíaco y la saturación de oxígeno de los músculos se

midieron continuamente durante el ejercicio para evaluar el efecto de la cafeína en estas variables. Se asignó un código alfanumérico a cada prueba por un individuo que no estaba involucrado en el estudio. Los investigadores y los participantes no tenían conocimiento de la asignación de los ensayos ni de las sustancias objeto de investigación. Todos los ensayos se realizaron en un laboratorio con condiciones ambientales constantes 21.5 ± 0.3 °C y $45 \pm 2\%$ de humedad relativa.

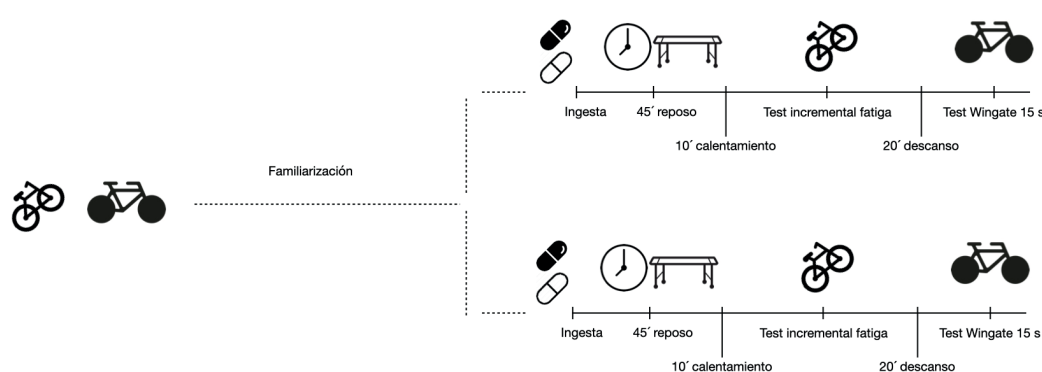


Figura 4.

Diseño experimental de los estudios 1 y 2.

Protocolo experimental. Una semana antes del comienzo del experimento, los participantes se familiarizaron dos veces con todos los protocolos de investigación. Además, se midió su masa corporal (± 50 g, Radwag, Polonia) para calcular la dosis adecuada de cafeína. Durante los protocolos de familiarización, se midió el grosor de los pliegues de la piel (Holtain Ltd, Bryberian, Crymmych, Pembrokeshire) en el bíceps, el tríceps y las zonas subescapular y suprailíaca para calcular la grasa corporal (Marfell-jones et al., 2006) y en el vasto lateral externo de ambas piernas (miembro derecho = 5.7 ± 2.5 mm, miembro izquierdo = 5.6 ± 2.0 mm). En los días de familiarización los investigadores mantuvieron una entrevista con el participante para descartar cualquier problema relacionado con la ingesta de cafeína o la realización de deporte. El día anterior a cada prueba experimental, los participantes se abstuvieron de todas las fuentes de cafeína dietética, de ejercicio extenuante y de alcohol, y adoptaron una dieta estandarizada, al igual que la ingesta de líquidos. Todas estas estandarizaciones se registraron en un diario durante el primer ensayo y luego se replicaron en el segundo ensayo.

El día de las pruebas, los participantes llegaron al laboratorio a las 9.00 AM en estado ayuno o vacío estomacal (al menos 3 horas después de su última comida). Se entregó al participante una bolsa no identificable con la cápsula que debería tomar para la realización del experimento. La cápsula se ingirió con un vaso de agua. Posteriormente, y tras colocarse ropa deportiva se colocaron un pulsómetro para la medición del ritmo cardíaco (Wearlink, Polar, Finlandia). A continuación, se colocó un espectrómetro de infrarrojo cercano (NIRS) (Moxy®, Fortiori Design LLC, Minnesota, EE.UU.) longitudinalmente en el músculo vasto lateral de cada miembro inferior, a mitad de camino entre el trocánter mayor y el epicóndilo lateral del fémur, para vigilar la saturación de O₂ de los tejidos. Este dispositivo ha demostrado ser fiable para medir la saturación local de oxígeno durante el ejercicio (coeficiente de correlación intraclase de 0.77 a 0.99; (Crum et al., 2017)). La posición de cada espectrómetro se marcó con un rotulador indeleble que se informó al participante que no se podía borrar para asegurar la posición entre días. Además, los espectrómetros se fijaron a la piel con una venda tubular elástica de red colocada alrededor del muslo (Vendafix, Favesam, España). La falta de movimiento de los espectrómetros se probó durante el calentamiento. La elección de la colocación de los espectrómetros viene determinada por formar parte del grupo de extensores de rodilla, que es el principal contribuyente a la producción de fuerza durante el golpe de pedaleo hacia abajo (Raasch et al., 1997) y es una ubicación utilizada para evaluar la oxigenación del músculo durante el ejercicio de ciclismo incremental (Racinais et al., 2014). Finalmente, los participantes descansaron en una camilla en posición supina hasta los 60 minutos para permitir la absorción de la sustancia experimental.

Después del período de descanso, los participantes realizaron un calentamiento estandarizado de 10 minutos en el cicloergómetro a 50 W y luego la intensidad del ejercicio se incrementó progresivamente en 25 W/min (prueba de test incremental) hasta la fatiga volitiva. Las revoluciones por minuto (RPM) fue elegida individualmente (entre 75 y 90 RPM) pero se mantuvo durante toda la prueba de test incremental y se replicó en ambos ensayos experimentales. Los investigadores estuvieron revisando que estas revoluciones no bajasen. Las posiciones del asiento y el manillar en el cicloergómetro de la bicicleta se eligieron en las pruebas de familiarización y se replicaron para cada individuo en ambas pruebas experimentales. El mismo investigador, que estaba cegado a los tratamientos, proporcionó a los participantes en todos los ensayos el mismo estímulo y retroalimentación estandarizados.

Durante la prueba de ejercicio, la ventilación pulmonar, la presión parcial de oxígeno y el consumo de oxígeno (VO₂), y la frecuencia cardíaca se midieron continua-

mente y se registraron mediante un analizador respiración a respiración (Metalyzer 3B, Cortex, Alemania). Se utilizaron gases de calibración certificados (16.0% O₂; 5.0% CO₂, Cortex, Alemania). En la prueba de test incremental, se registró el trabajo realizado (W_{max}) como la carga de ejercicio en el ergómetro de la bicicleta en el momento en que los participantes dejaron de pedalear abruptamente o cuando la frecuencia de pedaleo de un individuo era inferior a 50 RPM. El VO_{2pico} se definió como el valor más alto de VO₂ obtenido durante la prueba. El valor absoluto de VO_{2pico} en el ensayo con placebo se utilizó para normalizar la intensidad del ejercicio que representaba cada carga de trabajo. Para esta normalización, el VO₂ de cada carga de trabajo se dividió por el VO_{2pico} individual en el ensayo con placebo, y la carga relativa (es decir, el % del VO_{2pico} del placebo) se asignó entonces a la carga más cercana utilizando intervalos del 5%. En cada carga de trabajo, se promediaron todas las variables cada 15 segundos y se utilizaron los últimos 15 segundos de cada etapa como valor representativo de la carga de trabajo. La prueba de ejercicio se consideró máxima y válida cuando al final de la prueba se alcanzaron los siguientes criterios finales: El VO₂ se estabilizó a pesar de los aumentos en la potencia ergométrica, la tasa de intercambio respiratorio fue superior a 1.10, la calificación del participante del esfuerzo percibido (escala de Borg de 6 a 20 puntos) fue superior a 19 puntos, y la frecuencia cardíaca máxima fue superior al 80% de la estimación ajustada por edad de la frecuencia cardíaca máxima (Edwardsen et al., 2014). Un minuto después del final de la prueba calificada, se obtuvo una muestra sanguínea de la yema de un dedo de los participantes para analizar la concentración de lactato en la sangre (Lactate Pro 2, Arkay, Japón).

Análisis estadístico. Los resultados de cada prueba fueron introducidos a ciegas en el paquete estadístico SPSS v 20.0 para su posterior análisis. Las diferencias entre los protocolos de cafeína vs. placebo se determinaron mediante un análisis bidireccional de la varianza (sustancia × carga de trabajo) con medidas repetidas. Después de una prueba F significativa (corrección de Geisser-Greenhouse para el supuesto de esfericidad), se identificaron las diferencias entre las medias utilizando el post-hoc HSD de Tukey. La diferencia en los valores máximos de cafeína vs. placebo para todas las variables se identificó con la prueba T de Student para las muestras emparejadas. El nivel de significación se fijó en $P < 0.05$ y todos los datos se presentaron como medias \pm DS.

Resultados

En comparación con el placebo, la ingesta de cafeína mejoró el W_{\max} . La mejora fue de $5.2 \pm 3.8\%$ (258 ± 50 vs 271 ± 54 W, respectivamente, $P < 0.001$). Además, 1 min después del final de la prueba de test incremental, la concentración de lactato en sangre se incrementó un $14.3 \pm 3.6\%$ con la ingestión de cafeína (11.9 ± 3.8 vs 13.7 ± 3.5 mmol/L, $P = 0.029$). Sin embargo, la calificación del esfuerzo percibido al final del ejercicio fue muy similar, independientemente de si se ingirió un placebo o cafeína (19.3 ± 0.9 vs 19.2 ± 1.0 ; $P = 0.800$).

Durante el ejercicio, hubo un efecto en el día de ingesta de cafeína en la saturación de oxígeno del músculo ($F = 6.28$, $P = 0.029$). Mientras que la comparación por pares detectó diferencias entre la cafeína y el placebo a los 29 ± 3 , 39 ± 3 , 51 ± 2 y $61 \pm 3\%$ del $VO_{2\text{pico}}$ del placebo (Figura 5). Sin embargo, el valor más bajo de saturación de oxígeno muscular, obtenido al final del ejercicio, no fue diferente entre los tratamientos (26.8 ± 14.5 vs $26.9 \pm 14.5\%$, $P = 0.295$).

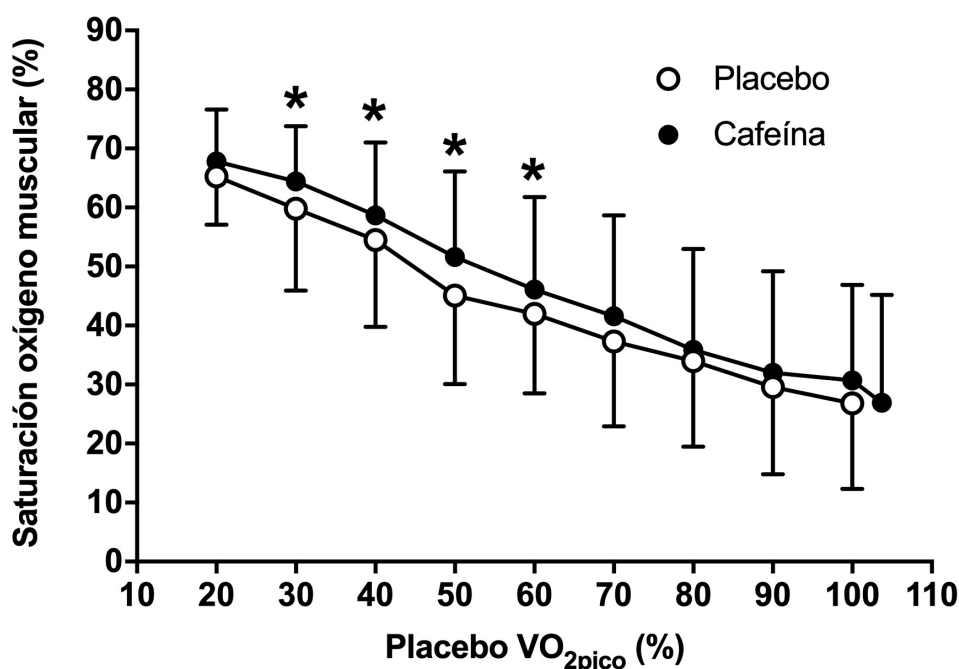


Figura 5.

Saturación de oxígeno en el músculo durante un test incremental hasta la fatiga tras la ingesta de 3 mg/kg de cafeína o un placebo. Los datos son la media \pm DS para 13 individuos sanos y activos. () La cafeína es diferente comparado con el placebo $P < 0.05$.*

En la ventilación pulmonar no se detectó un efecto la cafeína con respecto a la ingesta de placebo ($F = 0.60$, $P = 0.460$), pero el pico de ventilación pulmonar fue mayor con la cafeína en un $6.1 \pm 8.5\%$ (124 ± 29 vs 129 ± 23 L/min, $P = 0.035$). En la presión parcial de O_2 no se encontró ningún efecto principal de la cafeína ($F = 0.10$, $P = 0.759$) y la presión parcial de O_2 permaneció sin cambios con la cafeína (115 ± 5 vs 115 ± 4 mmHg, $P = 0.278$). En el VO_2 no se detectó el efecto principal de la cafeína ($F = 0.31$, $P = 0.589$) pero el pico de VO_2 se incrementó en $4.5 \pm 10.6\%$ con la cafeína (3.18 ± 0.70 vs 3.33 ± 0.88 L/min, $P = 0.032$; figura 6). En cuanto a la frecuencia cardíaca, no hubo un efecto principal de la cafeína ($F = 3.77$, $P = 0.110$) y la frecuencia cardíaca máxima se mantuvo sin cambios con la cafeína (173 ± 11 vs 173 ± 11 latidos/min, $P = 0.403$).

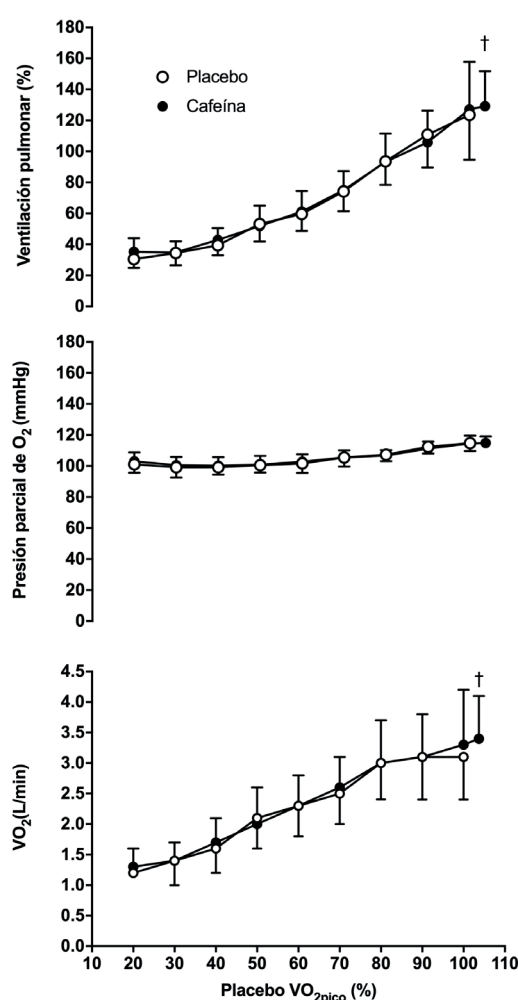


Figura 6.

Ventilación pulmonar, presión parcial de O_2 y captación de O_2 durante un test incremental hasta la fatiga tras la ingesta de 3 mg/kg de peso de cafeína o un placebo. Los datos son la media \pm DS para 13 individuos sanos y activos. (†) el valor máximo con cafeína es diferente del valor máximo con placebo en $P < 0.05$.

ESTUDIO 2: LA INGESTA AGUDA DE CAFEÍNA NO MODIFICA LA SATURACIÓN DE OXÍGENO DEL MÚSCULO DURANTE LA PRUEBA DE TEST ANAERÓBICO WINGATE DE 15 SEGUNDOS

Objetivos

El objetivo de la segunda investigación de la presente tesis doctoral se centró en analizar el efecto de la saturación de oxígeno muscular en el vasto lateral externo durante una prueba anaeróbica Wingate de 15-s después de una ingesta aguda de 3mg/kg de cafeína.

Materiales y métodos

Participantes. Quince participantes sanos y activos (7 mujeres y 8 hombres) (> 4 días de entrenamiento por semana; > 45 min día) participaron en esta investigación de manera voluntaria. Tenían una media \pm DS de peso 67.4 ± 12.3 kg; altura 171.3 ± 6.9 cm; edad 31 ± 6 años. En esta investigación participaron siete mujeres que se encontraban en la fase lútea de su ciclo menstrual en el momento de la medición (Lara, Gutiérrez-Hellín, Ruíz-Moreno, et al., 2020). Su ciclo menstrual fue monitoreado 4 meses antes del protocolo experimental usando una aplicación móvil (Mycalendar®, period-trucker, US) para de esta manera poder certificar que estaban en esa fase. Todos los participantes consumían pequeñas dosis de cafeína, sin embargo, se les aconsejó realizar una limpieza de la sustancia 7 días antes y por lo tanto no ingerir ningún alimento ni sustancia con cafeína en ese tiempo. Los criterios de inclusión fueron, personas no fumadoras, no haber reportado problemas cardiopulmonares previos en su historial clínico y no haber tenido lesiones musculo esqueléticas en los últimos 3 meses. Una semana antes de su participación, se les informó del proceso experimental, de los riesgos que conlleva el consumo de cafeína, y se les pidió que firmaran un consentimiento escrito para participar en la investigación. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la investigación en la Universidad Camilo José Cela de acuerdo con la Declaración de Helsinki en 2013.

Diseño experimental. En esta investigación se utilizó un diseño experimental aleatorio, doble ciego, controlado por placebo y cruzado. Los participantes realizaron dos pruebas previas idénticas que se separaron 48 horas entre ellas para permitir la eliminación de la sustancia y la recuperación total. La cápsula asignada para cada prueba se administró con 150 mL de agua, 60 minutos antes del inicio de las prue-

bas. Finalmente, fue asignado al azar el día de ingesta de celulosa como placebo (Guinama, España), o 3 mg de cafeína por kg de peso corporal (Bulk Powders, Reino Unido). Ni los sujetos ni los investigadores disponían de información sobre la asignación de la sustancia, y se asignó un código alfanumérico a cada ensayo por un individuo que no participaba en el estudio. Todas las pruebas se realizaron en el interior del laboratorio para garantizar unas condiciones ambientales constantes 21.5 ± 0.3 °C y $45 \pm 2\%$ de humedad relativa.

Protocolo experimental. Una semana antes del proceso experimental, los participantes asistieron dos veces para familiarizarse con la prueba anaeróbica Wingate de 15-s y los protocolos. En esos días, se midió su peso corporal (50g, Radwag, Polonia) para calcular la dosis de cafeína y placebo. Antes de la prueba, se midieron los pliegues de la piel en el vasto externo del cuádriceps de ambas piernas (miembro izquierdo 5.6 ± 1.8 cm; miembro derecho 5.6 ± 2.3 cm) utilizando la misma metodología que (Van Beekvelt et al., 2001). 7 días antes se aconsejó a los participantes que se abstuvieran de todo alimento que contuviera cafeína, que no bebieran alcohol y que adoptaran una dieta estandarizada y una ingesta de líquidos que debería repetirse el día anterior a la segunda prueba. Se aconsejó una dieta con mezcla de macronutrientes.

El día de las pruebas, los participantes llegaron al laboratorio a las 9.00 AM con al menos 3 horas después de su última comida. Posteriormente, los investigadores les administraron la cápsula experimental en una bolsa no identificable. Los sujetos ingirieron la cápsula con agua. Además, en ese momento se colocó una espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) longitudinalmente en el vasto lateral de cada miembro inferior, concretamente a 3 cm de la rótula, en el medio de los trocánteres y el epicóndilo lateral del fémur, para vigilar la saturación de O_2 del tejido. Se eligió el músculo vasto lateral porque es la parte de la pierna del grupo extensor, que es el principal contribuyente a la producción durante el pedaleo y también el principal lugar para asegurar la oxigenación del músculo durante un test Wingate (Raasch et al., 1997). Este dispositivo ha demostrado tener fiabilidad en una medición local de la saturación de oxígeno durante el ejercicio (coeficiente de correlación intraclase de 0.77 a 0.99 (Crum et al., 2017)). La posición del dispositivo se repitió en la segunda prueba, debido a la marcación de la zona con un rotulador indeleble, por lo que nos aseguramos de que siempre estuvieran en el mismo lugar en la extremidad. Ambas NIRS se aplicaron siempre a la misma pierna, porque cada una tenía un código identificable. En cuanto a la colocación de las NIRS, se fijaron firmemente a la piel con una red tubular y además se usó un culote de ciclista corto para asegurar que el

dispositivo no se balanceara en la pierna. Después, los sujetos se tumbaron en una camilla en posición supina 60 minutos antes de la prueba para facilitar la absorción de la sustancia (Magkos & Kavouras, 2005).

Tras el período de descanso, los participantes realizaron un calentamiento de 10 minutos en un cicloergómetro a 50 W e inmediatamente después realizaron una prueba incremental hasta la fatiga. Este protocolo fue utilizado en otras investigaciones ya publicadas (Lara, Gutiérrez-Hellín, Ruíz-Moreno, et al., 2020). Posteriormente, realizaron un descanso activo de 10 minutos pedaleando a 50 W, y finalizaron haciendo una versión adaptada del test de Wingate durante 15 segundos. La prueba se realizó en un cicloergómetro (SNT Medical, Cardgirus, España), los investigadores aplicaron en el software de cicloergómetro una resistencia que representaba el 7.5% de la masa corporal del participante. Todos los sujetos llevaron a cabo una serie de premisas obligatorias para llevar a cabo la prueba: a) inicio en posición de sentado en el sillín del cicloergómetro b) pierna dominante lista para pedalear c) se les dijo a los participantes que “debían pedalear lo más rápido posible desde el principio y durante toda la duración de la prueba”. La prueba anaeróbica de Wingate se consideró válida cuando a) los participantes permanecieron sentados durante toda la prueba b) después de la siguiente orden dada por los investigadores: “YA”, la carga de resistencia se aplicó progresivamente en un plazo de 1 s para producir una fase de aceleración c) los participantes terminaron la prueba después de los 15-s (Lara, Gutiérrez-Hellín, Ruíz-Moreno, et al., 2020). Durante la prueba, el mismo investigador, el cual no sabía la sustancia que llevaban los sujetos, dio estímulo y retroalimentación estandarizados a los participantes en todos los ensayos. Durante la prueba Wingate, se obtuvo la potencia de ciclo con una frecuencia de 1 Hz y la potencia de ciclo máxima y media (W/kg) obtenida durante la prueba se registraron como se ha descrito anteriormente. Además, la potencia de ciclo máxima y mínima se utilizaron para calcular el índice de fatiga Wingate (%). 1 minuto después de finalizar la prueba, se obtuvo una muestra de sangre de la yema de un dedo para analizar la concentración de lactato en sangre (Lactato pro 2, Arkay, Japón, en mmol/L), y en ambas pruebas se tomó en el mismo dedo. Por último, se preguntó a los participantes sobre la potencia muscular que percibían durante la prueba que previamente habían utilizado (Lara, Gutiérrez-Hellín, Ruíz-Moreno, et al., 2020) (escala de 1 a 10 puntos) y el esfuerzo (6 a 20 puntos, escala de Borg) (Borg, 1982).

Análisis estadístico. Los resultados de cada ensayo se introdujeron a ciegas en el paquete estadístico SPSS v 20.0 para su posterior análisis. Prueba F previa y significativa (corrección de Geisser-Greenhouse para el supuesto de esfericidad). Las

diferencias entre los protocolos de cafeína y de placebo se determinaron mediante un análisis bidireccional de la varianza (sustancia × cargas de trabajo) con medidas repetidas. Las diferencias entre las medias se identificaron mediante un análisis post-hoc de Tukey HSD. La diferencia en los valores de pico, potencia media de salida y concentración de lactato en sangre con la cafeína frente al placebo para todas las variables se identificó con la prueba T de Student para las muestras emparejadas. El nivel de significación se fijó en $P < 0.05$ y todos los datos se presentan como media \pm DS.

Resultados

La ingesta de cafeína fue mayor en las variables mecánicas en comparación con el placebo. La ingesta de cafeína con respecto a la ingesta de placebo aumentó la potencia máxima $2.9 \pm 4.5\%$ (9.65 ± 1.38 vs 9.92 ± 1.41 W/kg, $P=0.038$), la potencia media $3.5 \pm 6.2\%$ (8.30 ± 1.08 vs 8.57 ± 1.12 W/kg, $P=0.044$) y la concentración de lactato en sangre $20.9 \pm 24.7\%$ (12.4 ± 2.6 vs 14.8 ± 4.0 mmol/L, $P=0.005$ (Figura 7)). Respecto los valores de saturación de oxígeno en el músculo, los resultados mínimos fueron muy similares cuando se ingirió cafeína en comparación con el placebo (23.1 ± 14.1 vs $23.4 \pm 14.1\%$, $P=0.94$). En cuanto a las respuestas individuales contestadas inmediatamente después de la prueba, el 67% (10 de 15) de los participantes informaron de un aumento en la sensación de la producción de potencia máxima y media. Sin embargo, la concentración de lactato en sangre aumentó en el 73% (11 de 15) de los sujetos, y en cuanto a la saturación de oxígeno muscular la cafeína disminuyó en comparación con un placebo con un 33% (5 de 15) (figura 6). Por otra parte, tras la prueba Wingate, la escala de Borg y la percepción de fuerza-velocidad fue muy similar (19.3 ± 1.3 vs 19.3 ± 0.8 puntos de la escala 6-20, $P= 0.80$) y (8.4 ± 0.8 vs 8.7 ± 0.9 puntos de la escala 1-10, $P= 0.43$).

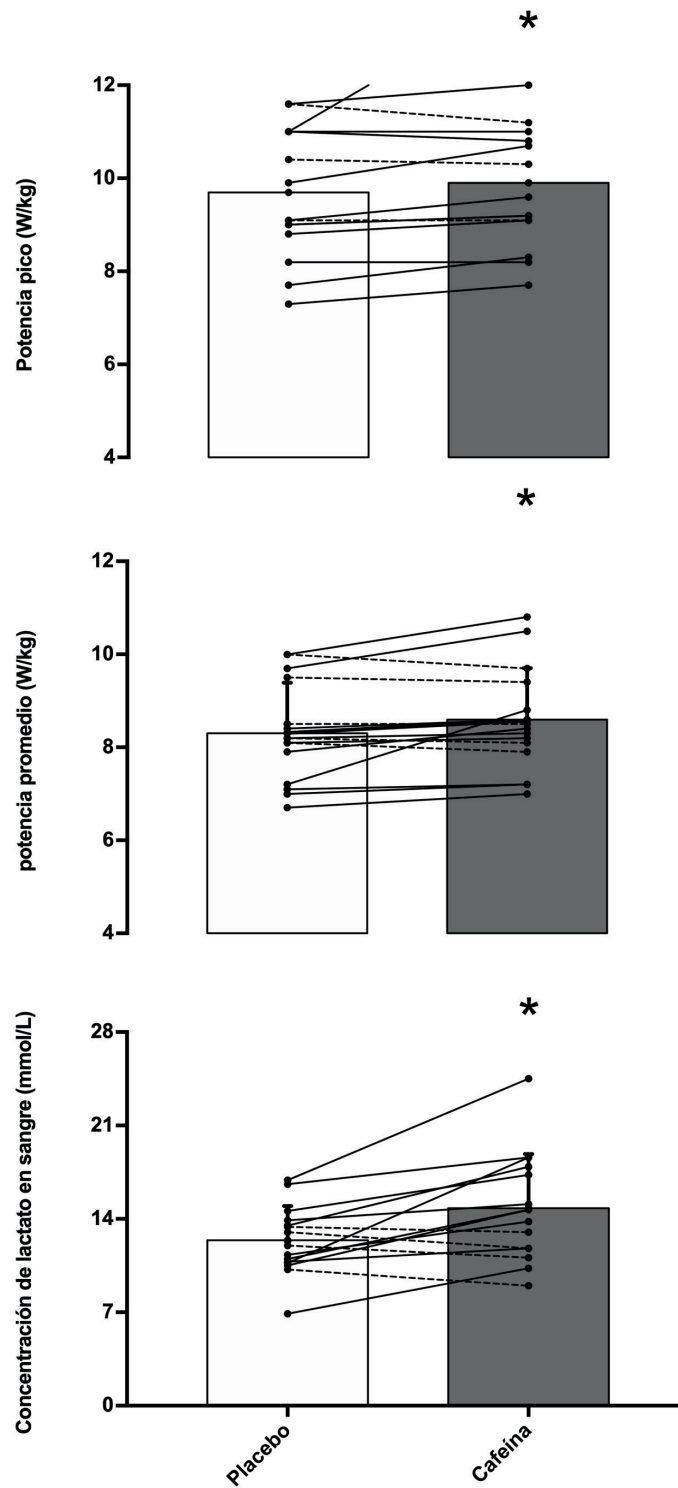


Figura 7.

Potencia máxima (W/kg), potencia media (W/kg) y concentración de lactato en sangre (mmol/L) al final de la prueba Wingate 15-s con administración de cafeína (3mg/kg) o un placebo. () Cafeína diferente de la condición de placebo P<0.05.*

La figura 8 muestra que la ingesta de cafeína comparada con la de un placebo no informó estadísticamente ningún efecto principal en la saturación de oxígeno del músculo ($F= 1.841$; $P= 0.198$). Además, el inicio de la saturación de oxígeno muscular fue similar en ambas condiciones (75.8 ± 8.1 vs. $72.3 \pm 9.5\%$, $P=0.13$). Las comparaciones por pares informaron de resultados similares que disminuyeron durante la prueba, lo que dio lugar a valores finales similares con una desoxigenación cuando se ingirió cafeína o placebo (67.7 ± 18.6 vs $66.2 \pm 20.5\%$, $P=0.37$ (Figura 8, panel inferior). Por el contrario, la ingesta de cafeína presentó un efecto principal en W/kg ($F=4.764$; $P=0.047$), reportando una pérdida de potencia similar con la ingesta de cafeína en comparación con una condición de placebo (27.5 ± 11.4 vs $25.7 \pm 10.7\%$, $P=0.399$). En cuanto las comparaciones pareadas cada segundo del test, la prueba post-hoc reveló diferencias en el segundo 2 (9.4 ± 1.4 vs. 9.6 ± 1.4 W/kg, $P= 0.011$) y en el segundo 10 (7.9 ± 1.3 vs 8.2 ± 1.1 W/kg, $P= 0.044$) en los vatios conseguidos cuando se ingirió cafeína (Figura 8, panel superior).

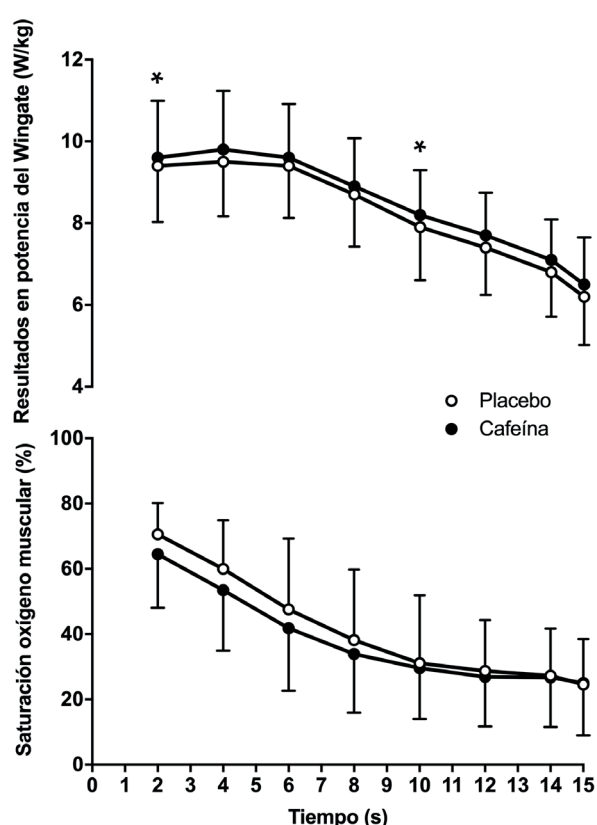


Figura 8.

Línea temporal de la salida de energía (W/kg) y la saturación de oxígeno muscular (%) durante la prueba Wingate 15-s con la administración de cafeína (3mg/kg) o una condición de placebo. Los datos son la media y DS para 15 participante. (*) Cafeína diferente a la condición del placebo $P<0.05$.

ESTUDIO 3: LA CAFEÍNA AUMENTA LA OXIDACIÓN DE LA GRASA DE TODO EL CUERPO DURANTE 1 HORA DE CICLISMO EN FATMAX

Objetivo

Investigar los efectos de una ingesta aguda de cafeína en la oxidación de sustratos energéticos durante una hora pedaleando a una intensidad de *Fatmax*.

Materiales y métodos

Participantes: Doce participantes jóvenes y sanos (8 hombres y 4 mujeres) se ofrecieron como voluntarios para participar en el estudio. El promedio de edad presentado con el promedio \pm DS fue de 29 ± 6 años, el promedio de masa corporal = 70.2 ± 9.2 kg, de altura = 1.75 ± 0.08 m y de $VO_{2max} = 50.7 \pm 12.1$ mL/kg/min). Un cálculo del tamaño de la muestra preexperimental indicó que se necesitaban al menos 11 participantes para obtener diferencias estadísticamente significativas cuando la tasa de oxidación de las grasas era 0,12 g/min más alto con la cafeína que con el placebo. El cálculo del tamaño de la muestra se basó en el efecto de la ingesta aguda de cafeína cuando se realiza el ciclo en *Fatmax* (Gutiérrez-Hellín & Del Coso, 2018), y se diseñó para obtener una potencia estadística del 80% con un error de tipo I fijado en el 5%. Los participantes cumplieron los siguientes criterios de inclusión: a) edad entre 18 y 40 años; b) entrenamiento consistente en ejercicios recreativos de ~ 1 h/día, al menos 4 días/semana durante los dos meses anteriores; c) bajo consumo habitual de cafeína (es decir, < 50 mg de cafeína por día en los 3 meses anteriores), según la definición de Filip et al., (2020); d) en las mujeres, duración regular de su ciclo menstrual durante los 4 meses anteriores. Se excluía a los participantes si informaban de: a) cualquier tipo de lesión en las extremidades inferiores en los dos meses anteriores; b) una situación positiva de fumadores; c) el uso de medicamentos o suplementos dietéticos en el mes anterior; d) antecedentes de enfermedades cardiopulmonares; e) el uso de anticonceptivos orales; f) alergia a la cafeína; g) en las mujeres, cualquier tipo de trastornos menstruales. Las mujeres realizaron todos los ensayos experimentales durante su fase luteínica para evitar la influencia del ciclo menstrual en los resultados de la investigación, a pesar de que las pruebas sugieren que la oxidación del combustible durante el ejercicio de intensidad submáxima (Frandsen et al., 2020; Horton et al., 2002) y la respuesta a la ingesta aguda de cafeína durante el ejercicio son similares a

lo largo del ciclo menstrual (Lara, Gutiérrez-Hellín, García-Bataller, et al., 2020; Lara, Gutiérrez-Hellín, Ruíz-Moreno, et al., 2020). Antes de inscribirse en el estudio, todos los participantes fueron informados de los procedimientos y riesgos experimentales y firmaron un consentimiento informado por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Camilo José Cela y se llevó a cabo de acuerdo con la última versión de la Declaración de Helsinki.

Diseño experimental: En esta investigación se utilizó un diseño experimental doble ciego, controlado por placebo, aleatorio y contrabalanceado. Cada participante participó en dos ensayos experimentales idénticos separados por al menos tres días. En estos ensayos, los participantes ingirieron 3 mg de cafeína por kg de masa corporal (Bulk Powders, Reino Unido) o 3 mg/kg de placebo (celulosa, Guinama, España). Se seleccionó una dosis de 3 mg/kg de cafeína, ya que se ha comprobado previamente que esta dosis es eficaz para aumentar la oxidación de las grasas en *Fatmax* (Gutiérrez-Hellín & Del Coso, 2018). Los tratamientos fueron ingeridos en cápsulas idénticas, no identificables, 60 minutos antes del comienzo del ejercicio. Un investigador independiente del estudio asignó un código alfanumérico a cada ensayo para que los participantes. Este código alfanumérico sólo se reveló después de que los ensayos fueran analizados. Cada ensayo consistió en 1 hora de ciclo continuo en *Fatmax* mientras que el gasto de energía y la oxidación del sustrato de los carbohidratos y la grasa se midieron por calorimetría indirecta. Se seleccionó una hora de ciclo continuo en *Fatmax* como protocolo de ejercicio para evaluar el efecto de la cafeína en la oxidación de las grasas durante el ejercicio ya que este protocolo ha sido utilizado en previas investigaciones (Gutiérrez-Hellín et al., 2020) y ha sido eficaz para detectar diferencias en la oxidación de grasas después de la ingestión de otras sustancias. Los ensayos se realizaron en una sala de laboratorio con temperatura ambiente controlada $20.3 \pm 0.4^{\circ} \text{C}$ y $31 \pm 11\%$ de humedad relativa.

Ensayo pre-experimental: Los participantes realizaron dos pruebas pre-experimentales: una prueba incremental para la oxidación de grasas en un cicloergómetro terminando con un cicloergómetro máximo para obtener *Fatmax* y $\text{VO}_{2\text{max}}$ y una prueba de familiarización. Una semana antes del comienzo del experimento, los participantes se sometieron a una prueba de ciclo máximo hasta la fatiga volitiva. Esta prueba fue precedida por un calentamiento estandarizado (es decir, 10 minutos a 50 W para los hombres y 30 W para las mujeres) en un cicloergómetro (SNT medical, Cardgirus, España). Después del calentamiento, la carga de trabajo se incrementó en 25 W para los hombres y 15 W para las mujeres cada 3 minutos hasta que la relación de intercambio

respiratorio alcanzó el 1.0. A partir de entonces, se produjeron cargas incrementales cada minuto hasta que el participante alcanzó la fatiga volitiva. Se instruyó a los participantes para que mantuvieran una cadencia de ciclo de 70 a 90 RPM durante toda la prueba. La prueba de ejercicio máximo terminó cuando los participantes no pudieron mantener una cadencia de ciclo > 50 RPM o cuando dejaron de pedalear debido a la fatiga. Durante la prueba de ejercicio máximo, se midió la captación de oxígeno (VO_2) y la producción de dióxido de carbono (VCO_2) respiración a respiración mediante un analizador de gases (Metalyzer 3B, Cortex, Alemania) y se calcularon las tasas de oxidación del sustrato en cada etapa con cálculos estequiométricos. En esta prueba se registró la intensidad que produjo la máxima tasa de oxidación de la grasa y se utilizó para los ensayos experimentales (*Fatmax*; la media \pm DS fue de 108 ± 50 W). Tres días antes del primer ensayo experimental, los participantes se sometieron a un ensayo de familiarización que replicaba los protocolos de los ensayos experimentales, como se explica a continuación.

Estandarizaciones: Una vez que los participantes cumplieron con los criterios de inclusión/exclusión, se les informó sobre la necesidad de abstenerse de todas las fuentes de cafeína (café, té, chocolate, bebidas energéticas, etc.) hasta que se completara el experimento. También se alentó a los participantes a que mantuvieran sus rutinas de entrenamiento y un estado físico estable durante el experimento. El día anterior a cada prueba, los participantes realizaron un entrenamiento ligero y estandarizado y se mantuvo una rutina de dieta/fluidos preseleccionada por ellos mismos. En todos los ensayos experimentales se dieron pautas sobre la dieta y los líquidos para asegurar la disponibilidad de carbohidratos (Burke et al., 2011) y la hidratación (Sawka et al., 2007). También se exigió a los sujetos que se abstuvieran de consumir alcohol y que mantuvieran un patrón de sueño con al menos 8 horas el día antes de cada ensayo. Estas estandarizaciones se escribieron en un diario personal y se repitieron minuciosamente el día anterior al segundo ensayo. Los datos sobre la dieta y el ejercicio fueron analizados después para asegurar que los participantes que cumplieran todas las recomendaciones dadas y la eutrofización fue certificada por la gravedad específica de la orina < 1.020 antes de cada prueba (MASTER-SUR/ Na , Atago, Japón). En las mujeres, la regularidad y la duración del ciclo menstrual fueron monitoreadas en cada participante durante 4 meses a través de una aplicación móvil gratuita (My-calendar®, Period-tracker, US).

Ensayos experimentales: El día de los ensayos experimentales, las participantes llegaron al laboratorio por la mañana a las 9.00 AM en estado de ayuno (al menos

8 horas después de su última comida). A su llegada, la cápsula con el tratamiento experimental (cafeína o placebo) fue suministrada e ingerida por el participante con 150 mL de agua. Posteriormente, los participantes descansaron en posición supina durante 60 minutos para permitir la absorción de la sustancia. En los últimos 5 minutos del período de descanso, se registró la presión sanguínea de los participantes (M6 Comfort, Omron, Japón; por triplicado) y la frecuencia cardíaca (Wearlink+V800, Polar, Finlandia). Para el análisis se utilizó un promedio de tres mediciones de la presión sanguínea, realizadas con 1 min. entre cada medición. A continuación, los participantes se sometieron a un calentamiento estandarizado de 10 minutos con intensidad creciente hasta que alcanzaron su *Fatmax* individual (equivalente al $52.1 \pm 9.8\%$ de su VO_{2max}). El cicloergómetro se configuró para mantener esta intensidad de ejercicio y los participantes pedalearon a esta intensidad durante 1 hora. La posición del sillín y el manubrio en el cicloergómetro, la ropa utilizada y la cadencia de ciclismo se reprodujeron meticulosamente en ambos recorridos. Se obtuvieron datos de VO_2 y VCO_2 respiración por respiración durante toda la prueba con el analizador de gas utilizado para la prueba VO_{2max} . Se utilizaron como valor representativo los últimos 60 s de cada período de 5 minutos del VO_2 y VCO_2 . Las tasas de gasto de energía y de oxidación de los sustratos se calcularon a partir del VO_2 y el VCO_2 utilizando el cociente respiratorio no proteínico (Brouwer, 1957). Los datos sobre el VO_2 y el VCO_2 para todo el ensayo (es decir, todas las respiraciones incluidas en el ensayo de ciclos de 1 hora) se utilizaron para el cálculo de la cantidad total de energía gastada y las cantidades totales de grasa y carbohidratos oxidados. Durante el ejercicio, se registró la frecuencia cardíaca y la calificación de los participantes del esfuerzo percibido (6-20 unidades arbitrarias (u.a.) escala (Borg, 1982)) en intervalos de 5 minutos.

Al final de los ensayos, los participantes completaron un cuestionario ad-hoc sobre los efectos secundarios comunes después de la ingesta aguda de cafeína o de placebo. Este cuestionario incluía una escala de 1 a 10 puntos para evaluar cada elemento. Se informó previamente a los participantes de que un punto significaba una cantidad mínima de ese elemento y 10 puntos una cantidad máxima. Se proporcionó a los participantes una versión en línea de este cuestionario a través de WhatsApp, y el cuestionario contenía dos fases. En la primera fase, los participantes debían calificar sus sentimientos de nerviosismo, vigor, irritabilidad, problemas gastrointestinales, dolores musculares, dolor de cabeza y diuresis, y completaban este cuestionario 12 horas después del final del ejercicio para evaluar la intensidad de los efectos secundarios inducidos por la ingesta aguda de cafeína en el día del experimento. En las segundas fases del cuestionario, los participantes calificaron su nivel de insomnio durante la

noche después del ensayo experimental. Esta encuesta se completó en la mañana siguiente del experimento, una vez que los participantes completaron su sueño nocturno. Esta encuesta de dos fases se ha utilizado eficazmente para evaluar los efectos secundarios resultantes de la ingestión aguda de cafeína en personas que realizan varias situaciones de ejercicio (Lara et al., 2015; Salinero et al., 2014).

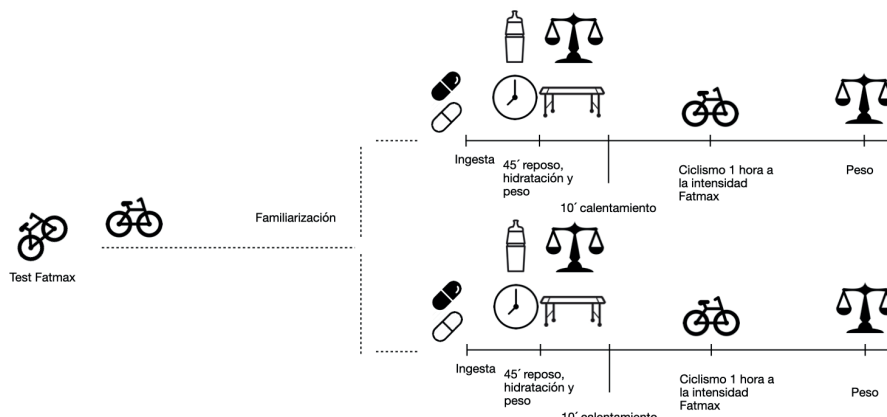


Figura 9.

Diseño experimental del estudio 3.

Análisis estadístico: Los datos del estudio se introdujeron a ciegas en el paquete estadístico SPSS (SPSS, v. 22.0, IBM SPSS Statistics, IBM Corporation) y se analizaron posteriormente. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para confirmar la normalidad de las variables cuantitativas y, en consecuencia, se utilizó la prueba de estadística paramétrica para determinar las diferencias entre los ensayos. Se realizó un análisis bidireccional de la varianza (ANOVA) (sustancia×tiempo) para analizar el efecto principal de la cafeína en todas las variables investigadas. Después de completar una prueba F significativa (corrección de Greenhouse-Geisser para el supuesto de esfericidad) para el efecto principal de la cafeína, se identificaron las diferencias en las comparaciones cafeína-placebo en cada medición de 5 minutos mediante pruebas post-hoc LSD. Se utilizaron pruebas t emparejadas para detectar diferencias en la comparación cafeína-placebo en la frecuencia cardíaca en reposo, la presión sanguínea en reposo, los valores generales del gasto energético, la oxidación de grasas y carbohidratos durante el ejercicio y en las calificaciones de los efectos secundarios después del ejercicio. En todas las pruebas estadísticas se estableció un nivel de significación de $P < 0.05$. Los datos se presentan como media \pm DS. El ES (tamaño del efecto) (\pm 95% intervalos de confianza (IC)) se calculó en todas las comparaciones por pares (Hopkins et al., 2009). El umbral del efecto significativo más pequeño se fijó en 0.2, y se incluyó un descriptor cualitativo para representar la probabilidad de

superar este umbral. Los rangos de probabilidad <1% indicaban casi con certeza que no había posibilidades de cambio; 1% a 5%, muy improbable; 5% a 25%, improbable; 25% a 75%, posible; 75% a 95%, probable; 95% a 99%, muy probable; >99%, muy probable. Las diferencias se calificaron como poco claras cuando la probabilidad superaba >5% en ambas direcciones positiva/negativa (Hopkins et al., 2009).

Resultados

Antes del ejercicio, la ingesta aguda de cafeína aumentó la presión arterial sistólica, diastólica y media en comparación con la ingesta del placebo (Tabla 3; $P < 0.05$). Sin embargo, la cafeína no modificó la frecuencia cardíaca en reposo ($P = 0.62$).

Tabla 3. Variables cardiovasculares en reposo, y gasto de energía y sustratos oxidados durante 1 hora de ciclo a la intensidad que provoca la máxima oxidación de la grasa (Fatmax) tras la ingestión de cafeína o un placebo.

	VARIABLES (unidades)	PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO (90% CI)	INFERENCIA CUALITATIVA	P
Reposo	Frecuencia cardíaca (latidos/min)	549	559	0.2 (-0.3/0.6)	Incierto	0.62
	Presión sanguínea sistólica (mmHg)	116±13	12420	0.5 (0.2/0.8)	Muy probable	0.01
	Presión sanguínea diastólica (mmHg)	7110	7411	0.3 (0.1/0.6)	Probable	0.02
	Presión arterial media (mmHg)	8610	9113	0.5 (0.2/0.7)	Muy probable	0.01
Ejercicio	Total oxidación de grasas (g)	19.47.7	24.79.6	0.5 (0.1/0.9)	Probable	0.04
	Total oxidación de carbohidratos (g)	94.630.9	73.832.4	-0.8 (-1.4/-0.3)	Muy probable	<0.01
	Total gasto energético (kcal)	543175	559170	0.0 (-0.2/0.1)	Muy probable	0.71
	Promedio frecuencia cardíaca (latidos/min)	12513	1279	0.2 (-0.1/0.4)	Posible	0.30
	Promedio RIR	0.890.04	0.850.05	-1.1 (-1.9/-0.4)	Muy probable	0.04

Los datos son presentados como promedio DS de 12 participantes del estudio.

Durante el ejercicio, hubo un efecto significativo de la cafeína en la tasa de oxidación de las grasas ($P = 0.02$). El análisis post-hoc reveló que la tasa de oxidación de las grasas fue mayor con la cafeína que con el placebo en todas las comparaciones por pares durante el ensayo de ciclos de 1 hora (todas $P < 0.05$, Figura 10A). Además, hubo un efecto principal de la cafeína en la tasa de oxidación de los carbohidratos ($P = 0.02$), mientras que el análisis post-hoc reveló que la cafeína disminuyó la tasa de oxidación de los carbohidratos de min-10 a min-60 (todos los $P < 0.05$, Figura 10B). Sin embargo, no hubo un efecto principal de la cafeína en el gasto de energía ($P = 0.60$; Figura 10C). En conjunto, la cafeína aumentó la cantidad total de grasa oxidada durante el ensayo en comparación con el placebo (Tabla 3; $P = 0.04$), al tiempo que se redujo la cantidad de carbohidratos utilizados ($P < 0.01$). La ingestión de cafeína no modificó la cantidad de energía gastada durante el ensayo ($P < 0.71$).

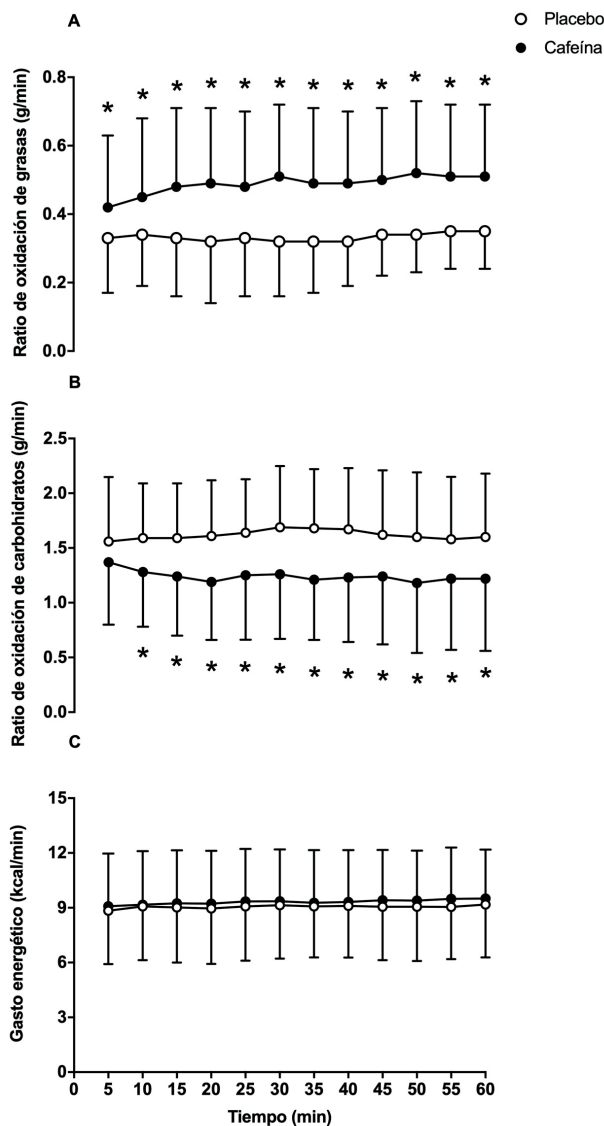


Figura 10.

Tasa de oxidación de grasas (A), tasa de oxidación de carbohidratos (B) y tasa de gasto de energía (C) durante 1 hora de ciclo a la intensidad que provoca la máxima oxidación de grasas (Fatmax) después de la ingestión de cafeína o del placebo. (*) Diferencias significativas entre la cafeína y el placebo $P < 0.05$.

Durante el ejercicio, hubo un efecto principal de la cafeína en la calificación del esfuerzo percibido ($P = 0.05$), y el análisis post hoc demostró que la calificación del esfuerzo percibido era más baja con la cafeína que con el placebo, en un rango del min -45 a min-60 (todos $P < 0.05$, Figura 11A). Además, hubo un efecto principal de la cafeína sobre el VO_2 ($P = 0.03$), ya que el análisis post hoc indicó que el VO_2 era mayor con la cafeína que con el placebo en varios puntos temporales durante el ejercicio (todos $P < 0.05$, Figura 11B). Sin embargo, no hubo un efecto principal de la cafeína en la frecuencia cardíaca ($P = 0.20$; Figura 11C).

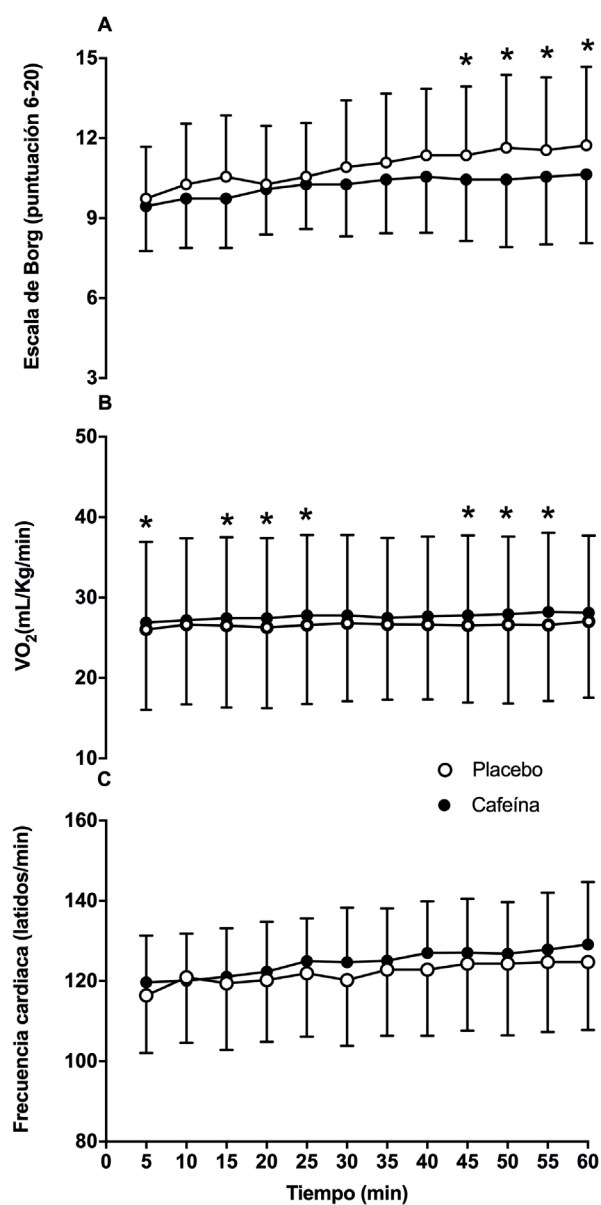


Figura 11.

Calificación perceptiva del esfuerzo (A), VO_2 (B) y frecuencia cardíaca (C) durante 1 hora de ciclo a la intensidad que provoca la máxima oxidación de la grasa (Fatmax) después de la ingestión de cafeína o placebo. (*) Diferencias significativas entre la cafeína o placebo $P < 0.05$.

Después del ejercicio, los participantes informaron de mayores puntuaciones de nerviosismo y vigor en el ensayo de cafeína frente al ensayo del placebo (Tabla 2; $P < 0.05$). Aunque no hubo diferencias estadísticas en los efectos secundarios restantes, los tamaños del efecto de la cafeína aguda sobre el malestar gastrointestinal, la diuresis y el insomnio fueron >1.0 .

Tabla 4. Calificación de los principales efectos secundarios en las 24 horas posteriores a la ingestión de cafeína o un placebo.

Variable (unidades)	Placebo	Cafeína	Tamaño del efecto (95%CI)	Inferencia cualitativa	P
Nerviosismo (u.a.)	1.31.2	3.72.4	2.1 (1.2/2.9)	Demasiado probable	0.01
Vigorosidad (u.a.)	1.61.8	4.72.9	1.8 (0.8/2.8)	Muy probable	0.04
Irritabilidad (u.a.)	1.20.6	1.51.5	0.2 (-0.8/1.2)	Improbable	0.73
Dolor muscular (u.a.)	1.61.5	1.41.4	-0.1 (-0.8/0.5)	Improbable	0.79
Dolor de cabeza (u.a.)	2.12.2	1.62	-0.2 (-0.9/0.5)	Improbable	0.66
Dificultad gastrointestinal (u.a.)	1.10.6	2.22.0	1.2 (0.2/2.3)	Probable	0.12
Diuresis (u.a.)	1.20.6	2.42.1	1.2 (0.0/2.3)	Probable	0.16
Insomnio (u.a.)	1.10.4	2.82.7	1.8 (0.1/3.5)	Probable	0.11

Los datos se muestran como la media DS para 12 participantes sanos. Cada efecto secundario fue auto-reportado usando una escala de 1-10 unidades arbitrarias (u.a.). CI: intervalo de confianza.

ESTUDIO 4: CURSO DE TIEMPO DE TOLERANCIA A LOS BENEFICIOS DEL RENDIMIENTO DE LA CAFEÍNA

Objetivo

Determinar la existencia y el curso temporal de la tolerancia a los efectos ergogénicos de la cafeína mediante un protocolo de investigación longitudinal de 20 días.

Materiales y métodos

Participantes: Once individuos activos y sanos (>4 días de entrenamiento por semana; > 45 min. por día) se ofrecieron como voluntarios para participar en esta investigación. Tenían una edad media \pm DS de 32.3 ± 4.9 años, una altura de 171 ± 8 cm, una masa corporal de 66.6 ± 13.6 kg, una grasa corporal de $16.6 \pm 5.0\%$ y una absorción máxima de oxígeno (VO_{2max}) de 48.0 ± 3.8 mL/kg/min. En la muestra participaron tres mujeres en la muestra que siempre empezaban los tratamientos al principio de la fase lútea. Debido a que la duración de los tratamientos con cafeína/pla-cebo fue más larga que la fase lútea de las participantes femeninas, los últimos días de cada tratamiento ocurrieron en la fase folicular. Una investigación anterior indicó que la farmacocinética de la cafeína es similar en todas las fases del ciclo menstrual (Kamimori et al., 1999), por lo tanto, es poco probable que el cambio de la fase lútea a la folicular dentro del mismo tratamiento tuviera algún efecto en los resultados de esta investigación (Lara, Gutiérrez-Hellín, García-Bataller, et al., 2020). Todos los participantes consumían poca cafeína al día (< 50 mg/día de (Filip et al., 2020)), eran no fumadores y no tenían antecedentes de enfermedades cardiopulmonares o lesiones musculo esqueléticas en los tres meses anteriores. Toda esta información se obtuvo de un examen previo a la participación que incluía un historial médico y de capacitación y un cuestionario sobre la frecuencia de los alimentos. También se advirtió a los participantes a que evitaran los medicamentos o los suplementos nutricionales mientras durara el estudio. Una semana antes del inicio del estudio, los participantes fueron informados de los procedimientos experimentales y de los riesgos y molestias asociados a la investigación y dieron su consentimiento informado por escrito para participar en la investigación. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Camilo José Cela y se ha realizado de conformidad con las normas éticas establecidas en la Declaración de Helsinki de 1964 y sus posteriores enmiendas o normas éticas comparables.

Diseño experimental: En este estudio se utilizó un diseño experimental doble ciego, controlado por placebo, aleatorio y cruzado. Cada participante participó en dos protocolos idénticos y, por lo tanto, actuó como su propio control: en un protocolo, los participantes ingirieron una cápsula no identificable que contenía 3 mg de cafeína por kg de masa corporal cada día del protocolo (3 mg/kg/día; 100% de pureza, Bulk Powers, Reino Unido) durante 20 días consecutivos. En otro protocolo, ingirieron la misma cápsula, pero con un placebo (i.e. celulosa; 100% de pureza, Guinama, España) durante 20 días consecutivos. Las cápsulas se ingerían diariamente a las 9.00 horas con 250 mL de agua y en ayuno (al menos, 8 horas después de su última comida). Los participantes tuvieron que acudir al laboratorio a realizar las pruebas dos días antes del inicio de cada protocolo de ingestión (día 0), y tres veces por semana (es decir, el día 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18 y 20) dentro de cada tratamiento. Aunque, el día 11 de cada protocolo la pastilla se ingirió después de la realización de las pruebas para controlar si la cafeína seguía siendo ergogénica en la mitad del protocolo. Los participantes realizaron el mismo protocolo de ejercicios compuesto por una prueba de test incremental máximo en un cicloergómetro hasta la fatiga volitiva y la versión adaptada del test anaeróbico Wingate 15 segundos (Lara, Gutiérrez-Hellín, Ruíz-Moreno, et al., 2020). En el día 0 de cada tratamiento, no se ingería ninguna cápsula antes del ejercicio mientras que, en todos los días restantes, excepto uno, la medición del rendimiento del ejercicio siempre comenzaba 45 minutos después de la ingestión de la cápsula asignada. No obstante, la cápsula con cafeína/placebo se ingería el día 11 después de las mediciones de rendimiento para lograr 20 días de tratamiento consecutivo. Se optó por evaluar las variables de rendimiento tres veces por semana para tener suficiente sensibilidad para detectar con precisión la habituación a los efectos ergogénicos de la cafeína. El orden de los protocolos de ingestión de 20 días fue aleatorio y se separaron por 7 días para permitir la recuperación completa y el lavado de la cafeína. El cumplimiento de los tratamientos se examinó verbalmente a diario durante todo el experimento y no se informó de ninguna incidencia durante todo el experimento.

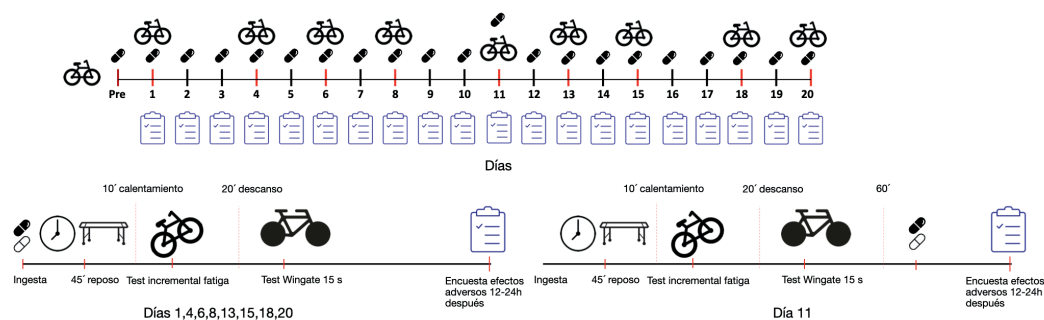


Figura 12.

Protocolo experimental de los estudios 4,5,6 y 7.

Estandarizaciones: Durante el mes anterior al inicio del experimento, los participantes se abstuvieron de todas las fuentes de cafeína a fin de eliminar cualquier hábito a la cafeína. El consumo de cafeína dietética (café, té, chocolate, refrescos, bebidas energéticas, etc.) y otros estimulantes también cesó mientras duró el experimento. También se alentó a los participantes a mantener sus rutinas de entrenamiento y a conservar un estado físico estable durante el experimento. Una semana antes del primer protocolo de ingestión, los participantes se sometieron a un examen médico de rutina para asegurarse de que gozaban de buena salud y eran aptos para el experimento. Los participantes se familiarizaron dos veces con todas las pruebas experimentales previas al protocolo experimental. También, se midió la masa corporal (± 50 g, Radwag, Polonia) para calcular la dosis de cafeína. La temperatura y la humedad ambiental se mantuvieron constantes en todos los ensayos experimentales 21.3 ± 0.3 °C de temperatura y $30 \pm 10\%$ de humedad relativa. El mismo investigador, que estaba cegado a los tratamientos, proporcionó a los participantes en todos los ensayos estímulo y retroalimentación estandarizados. Las posiciones del asiento y el manillar en el cicloergómetro de la bicicleta se obtuvieron en las pruebas de familiarización y se replicaron para cada individuo en todas las pruebas.

Ensayos experimentales: El día 0, los participantes llegaron al laboratorio a las 8:00 PM y se les midió el porcentaje de grasa corporal por impedancia bioeléctrica (B-418, Tanita, Japón). A continuación, los participantes se vistieron con ropa deportiva y se les colocó un pulsímetro (Wearlink, Polar, Finlandia) que se fijó a su pecho. Después de eso, descansaron en posición supina durante 45 minutos. Durante los últimos 5 min. del período de descanso se midió la frecuencia cardíaca en reposo y la presión sanguínea sistólica y diastólica (M6 Comfort, Omron, Japón).

Después de las mediciones en reposo, los participantes realizaron un calentamiento estandarizado de 10 minutos en un cicloergómetro (SNT Medical, Cardgirus, España) a 50 W. La intensidad del ejercicio se incrementó progresivamente en 25 W/min (incrementos escalonados) hasta la fatiga volitiva. La frecuencia de pedaleo fue elegida individualmente (entre 75 y 90 RPM) pero se mantuvo durante toda la prueba de test incremental y se replicó en todos los ensayos experimentales. Durante la prueba, la captación de oxígeno (VO_2) se midió continuamente mediante un analizador respiración a respiración (Metalyzer 3B, Cortex, Alemania) y los datos se promediaron cada 15 segundos. En esta prueba de test incremental, se determinaron los vatios alcanzados en el agotamiento (W_{max} ; potencia máxima aeróbica) y el $\text{VO}_{2\text{max}}$. W_{max} se registró como la carga de ejercicio en el cicloergómetro de la bicicleta en el momento en que los participantes dejaron de pedalear abruptamente o cuando la frecuencia de pedaleo de un individuo era inferior a 50 RPM. El $\text{VO}_{2\text{max}}$ se definió como el valor más alto de VO_2 obtenido durante la prueba. El $\text{VO}_{2\text{max}}$ se consideró válido cuando: a) los participantes calificaron su esfuerzo percibido como superior a 19 en la escala de Borg (Borg, 1982), b) la diferencia de VO_2 entre las dos últimas cargas de trabajo consecutivas fue inferior a 0.10 L/min, c) la relación de intercambio respiratorio fue superior a 1.10, d) la frecuencia cardíaca fue superior al 80% de la estimación ajustada en función de la edad de la frecuencia cardíaca máxima o e) la concentración de lactato fue superior a 7 mmol/L (Edwardsen et al., 2014). Se utilizaron gases de calibración certificados (16.0% O_2 ; 5.0% CO_2 , Cortex, Alemania) y una jeringa de 3 L para calibrar el analizador de gas y el medidor de flujo antes de cada prueba. Un minuto después del final de la prueba graduada, se obtuvo una muestra de sangre para analizar la concentración de lactato en la sangre (Lactate Pro 2, Arkay, Japón).

Posteriormente a la prueba de test incremental máximo, los participantes continuaron pedaleando a 50 W durante 7 min. Tras la finalización de estos 7 minutos, realizaron una prueba de Wingate de 15 segundos en el mismo cicloergómetro de ciclo (SNT Medical, Cardgirus, España) y con una carga que representaba el 7.5% de la masa corporal, como se describió anteriormente (Hachana et al., 2012). Para esta prueba, los participantes partieron de una posición estacionaria con su pierna dominante lista para pedalear y se les dijo que “debían pedalear lo más rápido posible desde el principio y durante toda la duración de la prueba”. Después del comando de “YA”, la carga de resistencia se aplicó progresivamente en un plazo de 3 s para producir una fase de aceleración, como se sugirió anteriormente (Bar-Or, 1987). El investigador verificó que los participantes permanecieron sentados durante toda la prueba. Durante la prueba Wingate, se obtuvo la potencia de ciclo con una frecuen-

cia de 1 Hz y se registró la potencia de ciclo máxima y media obtenida durante la prueba. Un minuto después del final de la prueba, se midió la concentración de lactato en sangre como se describió anteriormente.

Se preguntó a los participantes sobre su percepción de resistencia y esfuerzo justo después de la prueba de test incremental y sobre su autopercepción de la potencia muscular justo después de la prueba Wingate de 15-s. Este cuestionario incluía una escala de 1 a 10 puntos para evaluar cada ítem, y a los participantes se les informó previamente que 1 punto significaba una cantidad mínima y 10 puntos una cantidad máxima del mismo. El cuestionario se ha utilizado anteriormente para evaluar la ergogenicidad percibida después de la ingestión de cafeína (Salinero et al., 2014).

El protocolo descrito anteriormente para el día 0 se repitió para cada día de medición durante los 20 días de tratamiento (i.e, los días 1, 4, 6, 8, 13, 15, 18 y 20) pero con la administración de cafeína o placebo 45 minutos antes del inicio de las pruebas de rendimiento. El día 11, los participantes ingirieron la cápsula asignada después del final de las pruebas de ejercicio para producir un protocolo de ingestión continuo de 20 días. Siete días después de la finalización del primer protocolo de ingestión (placebo o cafeína), el protocolo de ingestión restante se llevó a cabo imitando los procedimientos descritos anteriormente.

Análisis estadístico: Los datos se recogieron como se ha indicado anteriormente y los resultados de cada prueba se introdujeron posteriormente a ciegas en el paquete estadístico SPSS v 20.0 para su posterior análisis. La normalidad fue probada para cada variable con la prueba de Shapiro-Wilk. Todas las variables incluidas en esta investigación presentaron una distribución normal ($P > 0.05$) y se utilizaron estadísticas paramétricas para determinar la ergogenicidad de la cafeína. Las diferencias entre los protocolos de cafeína y de placebo se determinaron mediante un análisis bidireccional de la varianza (ANOVA)(sustancia \times día de ingestión) con medidas repetidas. Después de una prueba F significativa (corrección de Geisser-Greenhouse para el supuesto de esfericidad), se identificaron las diferencias entre las medias utilizando el post-hoc de Tukey HSD. El nivel de significación se fijó en $P < 0.05$.

El tamaño del efecto también se calculó en todas las comparaciones por pares para permitir un enfoque de inferencia basado en la magnitud (Hopkins et al., 2009). Específicamente, la estadística del tamaño del efecto \pm 90% de intervalos de confianza (CI) se usó en los datos transformados de logaritmo para reducir el sesgo debido a la falta de uniformidad del error. El umbral más pequeño de efecto estandarizado

significativo se fijó en 0.2, y se incluyó un descriptor cualitativo para representar la probabilidad de superar este umbral. Los rangos de probabilidad <1% indicaban casi con certeza que no había posibilidades de cambio; 1% a 5%, muy improbable; 5% a 25%, improbable; 25% a 75%, posible; 75% a 95%, probable; 95% a 99%, muy probable; >99%, muy probable. Las diferencias se calificaron como poco claras cuando la probabilidad superaba >5% en ambas direcciones positiva/negativa. Los tamaños de los efectos se interpretaron de acuerdo con los siguientes rangos: <0.2, trivial; 0.2-0.6, pequeño; 0.6-1.2, moderado; 1.2-2.0, grande; 2.0-4.0, muy grande y; >4.0, extremadamente grande (Hopkins et al., 2009).

Resultados

En las pruebas incrementales los valores de los vatios máximos (W_{\max}) fueron muy comparables para el día 0 en los protocolos de placebo y de ingestión de cafeína (3.99 ± 0.75 y 3.97 ± 0.75 W/kg, respectivamente; $P = 0.66$). En comparación con el placebo, la ingestión diaria de cafeína aumentó el W_{\max} en los ensayos realizados durante los primeros 18 días del protocolo de la cafeína (figura 13, panel inferior; $P < 0.05$), excepto el día 11, en el que se ingieren la cafeína y el placebo después de la prueba. Además, la ingesta diaria de cafeína también aumentó el W_{\max} para todo el tratamiento con respecto al día 0 del protocolo de la cafeína ($P < 0.05$). Por el contrario, W_{\max} se mantuvo constante en el protocolo de placebo. En las comparaciones por pares, el tamaño del efecto de la ingesta de cafeína en W_{\max} fue grande para el día 1 y el día 4 y disminuyó a moderado después (Figura 13, panel superior).

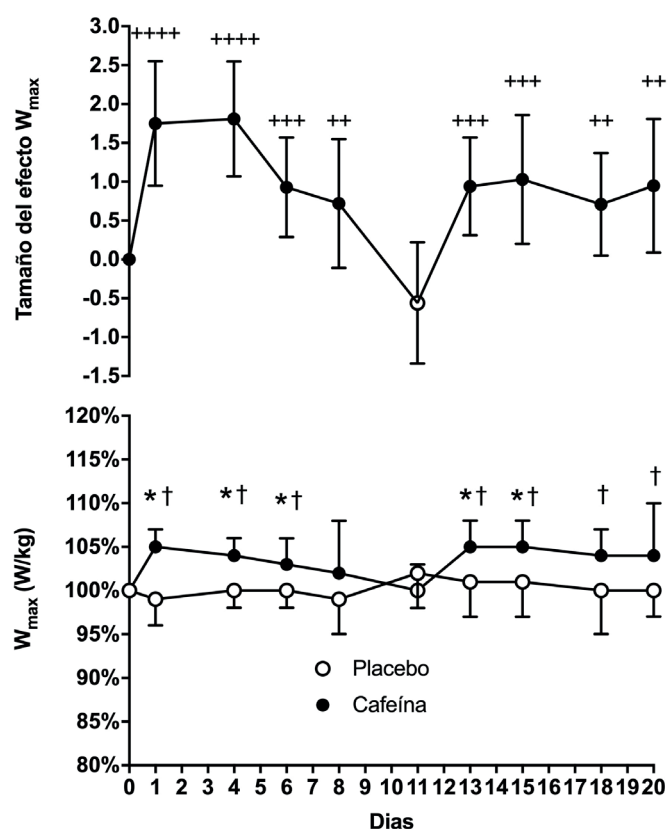


Figura 13.

Potencia máxima de ciclo (W_{max}) obtenida durante una prueba de test incremental con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (intervalos de confianza de $\pm 90\%$) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm desviación estándar. Los datos se han normalizado con respecto a los valores obtenidos en el día 0 de cada tratamiento para proporcionar una mejor comparación del efecto ergogénico de la cafeína en las variables estudiadas. (*) Cafeína diferente al placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$.

Los valores de VO_{2max} fueron similares para el día 0 en los protocolos de placebo y de ingestión de cafeína (47.9 ± 8.0 y 46.1 ± 8.4 mL/kg/min; $P = 0.19$). En la comparación diaria con el placebo, la ingestión de cafeína aumentó el VO_{2max} en los días 1 y 4 (Figura 14, panel inferior; $P < 0.05$), y en los días 1, 4 y 6 con respecto al día 0 del protocolo de la cafeína ($P < 0.05$). El VO_{2max} se mantuvo constante en el protocolo de placebo, excepto por una reducción en el día 1 con respecto al día 0 ($P < 0.05$). En las comparaciones por pares, el tamaño del efecto de la ingesta de cafeína sobre el VO_{2max} fue muy grande para el día 1, grande para el día 4 y de moderado a pequeño después (Figura 14, panel superior).

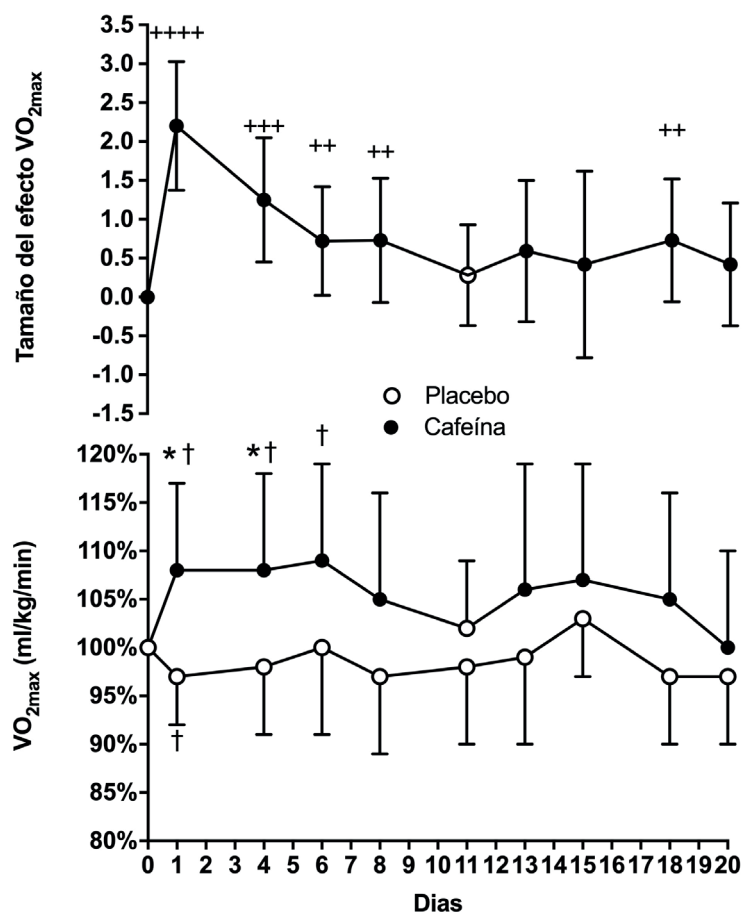


Figura 14.

Consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) obtenida durante una prueba de test incremental con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (intervalos de confianza de $\pm 90\%$) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm desviación estándar. Los datos se han normalizado con respecto a los valores obtenidos en el día 0 de cada tratamiento para proporcionar una mejor comparación del efecto ergogénico de la cafeína en las variables estudiadas. (*) Cafeína diferente al placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$.

La ingestión de cafeína aumentó la frecuencia cardíaca máxima en el día 1 y 8 con respecto al placebo (Tabla 5), pero no hubo ninguna otra diferencia estadísticamente significativa entre la cafeína y el placebo en los ensayos restantes. En las comparaciones por pares, el tamaño del efecto de la ingesta de cafeína sobre la frecuencia cardíaca máxima fue pequeño durante los primeros 8 días de ingesta y tendió a ser insignificante después. La ingestión de cafeína aumentó la ventilación máxima en los días 1 y 4 con respecto al placebo (Tabla 5), pero no produjo ninguna otra diferencia estadísticamente significativa para la comparación cafeína vs. placebo posterior. El tamaño del efecto de la cafeína en la ventilación máxima fue pequeño en los días 1 y 4 y luego se redujo. La concentración de lactato en sangre después de la prueba de test incremental en el día 1, y 15 (Tabla 6; $P < 0.05$) fue mayor con la ingesta de cafeína en comparación con el placebo y el tamaño del efecto en estos días fue moderado. Los participantes percibieron una mayor capacidad de resistencia en la prueba de ejercicio incremental con cafeína en comparación con el placebo en los días 1 y 13 (Tabla 7; $P < 0.05$) mientras que el tamaño del efecto de la cafeína fue pequeño en estos mismos días. Además, en los días 1, 13, 15 y 18 hubo un aumento significativo de la capacidad de resistencia percibida con respecto al día 0 del protocolo de la cafeína ($P < 0.05$). No hubo efectos de la cafeína sobre el esfuerzo percibido después de la prueba de ejercicio incremental, que siempre se percibió como > 9 puntos en la escala de 1 a 10 puntos (Tabla 7).

Tabla 5. Ritmo cardíaco máximo (latidos/min) y ventilación pulmonar máxima (L/min) durante un test incremental hasta la fatiga volitiva (VO_{2max}) de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.

Frecuencia cardíaca máxima (lpm)

DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO ($\pm 90\%$ CI)	INFERENCIA CUALITATIVA
0	177 \pm 12	178 \pm 13	0.1(-0.2-0.3)	Probable trivial
1	175 \pm 11	181 \pm 12*	0.4(0.1-0.7)	Probable positivo
4	176 \pm 10	179 \pm 8	0.3(0-0.6)	Posiblemente positivo
6	178 \pm 11	180 \pm 11	0.2(-0.2-0.5)	Posiblemente positivo
8	174 \pm 10	180 \pm 11*	0.5(0.2-0.7)	Probable positivo
11	177 \pm 9	172 \pm 10†	-0.5(-0.9-0)	Probable negativo
13	177 \pm 10	177 \pm 12	0.1(-0.3-0.5)	Improbable
15	175 \pm 13	179 \pm 8	0.2(-0.2-0.6)	Posiblemente positivo
18	176 \pm 10	177 \pm 10	0.1(-0.2-0.4)	Improbable
20	176 \pm 10	178 \pm 9	0.2(-0.1-0.5)	Posiblemente positivo

CI = intervalo de confianza; (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día "0" dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$.

Nota: En los días "0" y "11", tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ninguna cápsula.

Ventilaciones máximas (L/min)

PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO (±90% CI)	INFERENCIA CUALITATIVA
130±23	136±33	0.2(-0.1-0.50)	Posiblemente positivo
131±26	146 ±36*	0.5(0.1-0.8)	Probable positivo
134±24	148±34*†	0.5(0.2-0.7)	Probable positivo
138±32	142±37	0.1(-0.2-0.4)	Improbable
136±32	141±36	0.1(-0.1-0.4)	Posiblemente trivial
134±29	133±29	-0.0(-0.2-0.2)	Probable trivial
135±26	147±36	0.4(0.1-0.7)	Probable positivo
139±30	150±33†	0.3(0.1-0.6)	Probable positivo
136±31	143±33	-0.2(-0.1-0.5)	Posiblemente positivo
136±30	145±28†	0.3(0.1-0.6)	Probable positivo

Tabla 6. Concentración de lactato en sangre (mmol/L) después de un test incremental hasta la fatiga volitiva (VO_{2max}) y después de una prueba Wingate 15-s (Wingate) con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.

Test incremental

DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO ($\pm 90\%$ CI)	INFERENCIA CUALITATIVA
0	13.1 \pm 2.8	13.3 \pm 2.9	0.1(-0.5-0.6)	Improbable
1	11.8 \pm 3.3	14.0 \pm 2.8*	0.6(0.1-1.1)	Probable positivo
4	12.8 \pm 2.7	13.6 \pm 2.1	-0.1(-0.5-0.4)	Improbable
6	13.8 \pm 3.2	13.8 \pm 4.5	0.0(-0.7-0.6)	Improbable
8	12.7 \pm 3.2	13.1 \pm 2.4	0.1(-0.5-0.8)	Improbable
11	13.8 \pm 2.0	13.5 \pm 3.9	-0.4(-1.4-0.6)	Improbable
13	12.6 \pm 3.8	14.5 \pm 3.6	0.6(0.1-1.1)	Probable positivo
15	12.3 \pm 2.0	14.8 \pm 4.0*	0.9(0.0-1.9)	Probable positivo
18	12.9 \pm 3.4	15.0 \pm 4.8	-0.5(-0.3-1.3)	Improbable
20	13.3 \pm 3.5	12.8 \pm 3.1	-0.1(-0.8-0.6)	Improbable

CI = intervalo de confianza; (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día "0" dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$.

Nota: En los días "0" y "11", tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ninguna cápsula.

Test 15-s Wingate

PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO (±90% CI)	INFERENCIA CUALITATIVA
13.4±3.7	12.9±2.6	-0.0(-0.8-0.7)	Improbable
13.3±4.5	14.8±2.5†	0.4(-0.1-0.9)	Posiblemente positivo
12.2±3.6	14.5±2.8†	0.6(-0.2-1.6)	Probable positivo
12.3±3.5	14.0±4.5	0.4(-0.2-0.9)	Posiblemente positivo
12.3±4.3	14.9±4.0	0.5(-0.1-1.1)	Probable positivo
13.3±3.7	13.0±3.4	0.1(-0.3-0.5)	Improbable
11.9±2.8	13.9±4.8†	1.1(0.1-2.1)	Probable positivo
11.8±3.2	14.0±1.8†	1.0(0.4-1.7)	Muy probable positivo
13.8±4.6	13.4±4.2	-0.1(-0.9-0.7)	Improbable
14.0±4.4	13.9±2.0	0.1(-0.3-0.6)	Improbable

Tabla 7. Sensaciones subjetivas de resistencia y esfuerzo (escalas de 1 a 10 puntos) después de una prueba de test incremental, y potencia muscular percibida después de una prueba Wingate de 15-s con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.

DÍA	Percepción de resistencia				Esfuerzo percibido	
	PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO (±90% CI)	INFERENCIA CUALITATIVA	PLACEBO	CAFEÍNA
0	5.6±1.2	5.4±0.9	-0.1(-0.6-0.4)	Improbable	9.2±1.0	9.5±0.6
1	5.3±1.5	6.1±0.9*†	0.5(0.1-1.0)	Probable positivo	9.4±1.1	9.4±0.8
4	5.7±1.1	5.9±1.0	0.2(-0.3-0.8)	Improbable	9.4±0.8	9.5±0.7
6	5.9±0.9	5.8±0.9	-0.1(-0.4-0.3)	Improbable	9.5±0.7	9.6±0.7
8	5.3±1.5	5.5±1.8	0.1(-0.5-0.7)	Improbable	9.5±0.8	9.6±0.5
11	6.1±1.0	5.0±1.8	-1.3(-3.0-0.3)	Improbable	9.5±1.0	9.3±1.0
13	5.5±1.4	6.3±0.8*†	0.5(0.1-0.9)	Probable positivo	9.7±0.5	9.6±0.7
15	5.8±1.5	6.2±0.9†	0.2(0.3-0.8)	Improbable	9.6±0.7	9.7±0.5
18	5.8±1.0	6.1±0.9†	0.3(-0.2-0.8)	Posiblemente positivo	9.8±0.4	9.6±0.9
20	5.8±1.2	5.6±1.6	-0.1(-0.7-0.4)	Improbable	9.8±0.4	9.6±0.9

Nota: Todas las variables fueron evaluadas con escalas de 1 a 10 puntos, donde 1 punto significaba una cantidad mínima de la variable y 10 puntos significaban una cantidad máxima de esa variable (5 puntos era el valor usado para indicar que no se sentía ninguna diferencia con un día normal). CI = intervalo de confianza; (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día "0" dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$. Nota: En los días "0" y "11", tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ninguna cápsula.

Percepción de potencia

TAMAÑO DEL EFECTO (±90% CI)	INFERENCIA CUALITATIVA	PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO (±90% CI)	INFERENCIA CUALITATIVA
0.3(0-0.6)	Probable positivo	5.4±1.0	5.8±0.7	0.4(-0.1-0.9)	Posiblemente positivo
-0.1(-0.4-0.3)	Improbable	5.7±1.6	6.4±0.7 [†]	0.3(-0.2-0.8)	Posiblemente positivo
0.1(-0.5-0.7)	Improbable	6.0±0.7	6.2±1.1	0.0(-0.8-0.9)	Improbable
0.1(-0.1-0.3)	Posible positivo	6.3±0.6	5.7±1.3	-1.0(-2.2-0.2)	Improbable
0.1(-0.3-0.5)	Posiblemente negativo	5.0±1.5	5.1±1.7	0.1(-0.5-0.7)	Improbable
-0.2(-1-0.6)	Improbable	6.3±1.3	5.0±1.7	-1.0(-2.3-0.2)	Improbable
-0.2(-1.0-0.6)	Improbable	6.2±1.2	6.2±1.5	-0.1(-0.9-0.7)	Improbable
0.0(-0.6-0.6)	Improbable	5.8±1.2	5.8±1.4	0.0(-0.8-0.8)	Improbable
0.0(-0.4-0.3)	Improbable	5.9±1.2	6.1±1.1	0.2(-0.4-0.7)	Improbable
-0.2(1.5-1.0)	Improbable	5.7±0.0	6.3±0.9	0.6(-0.0-1.2)	Probable positivo

15-s Prueba Wingate: Los valores de la potencia máxima del test anaeróbico de Wingate 15-s fueron similares para el día 0 en los protocolos de placebo y de ingestión de cafeína (9.48 ± 0.44 y 9.35 ± 0.54 W/kg; $P = 0.39$). En comparación con el placebo, la ingesta diaria de cafeína aumentó la potencia máxima de Wingate en los días 1, 4, 15 y 18 (Figura 15, panel inferior; $P < 0.05$). La cafeína también aumentó la potencia máxima en el test los días 1, 4, 13, 15, 18 y 20 con respecto al día 0 del protocolo de la cafeína ($P < 0.05$). El tamaño del efecto de la ingesta de cafeína sobre la potencia máxima de Wingate fue grande en los días 1 y 4 y se redujo a moderado/pequeño después (Figura 14, panel superior). A partir de valores similares en el día 0 (8.22 ± 0.46 y 8.15 ± 0.43 W/kg; $P = 0.57$) la potencia media de ciclo de Wingate sólo aumentó con la cafeína en el día 1 de ingestión con respecto al placebo ($P < 0.05$), y en los días 1, 15 y 18 con respecto al día 0 del protocolo de la cafeína (Figura 16, panel inferior). El tamaño del efecto de la ingesta de cafeína en la potencia media de Wingate fue moderado en los días 1 y 4 disminuyendo a pequeño después (Figura 16, panel superior). Tanto la potencia máxima como la media de los ciclos se mantuvieron estables en el protocolo de placebo.

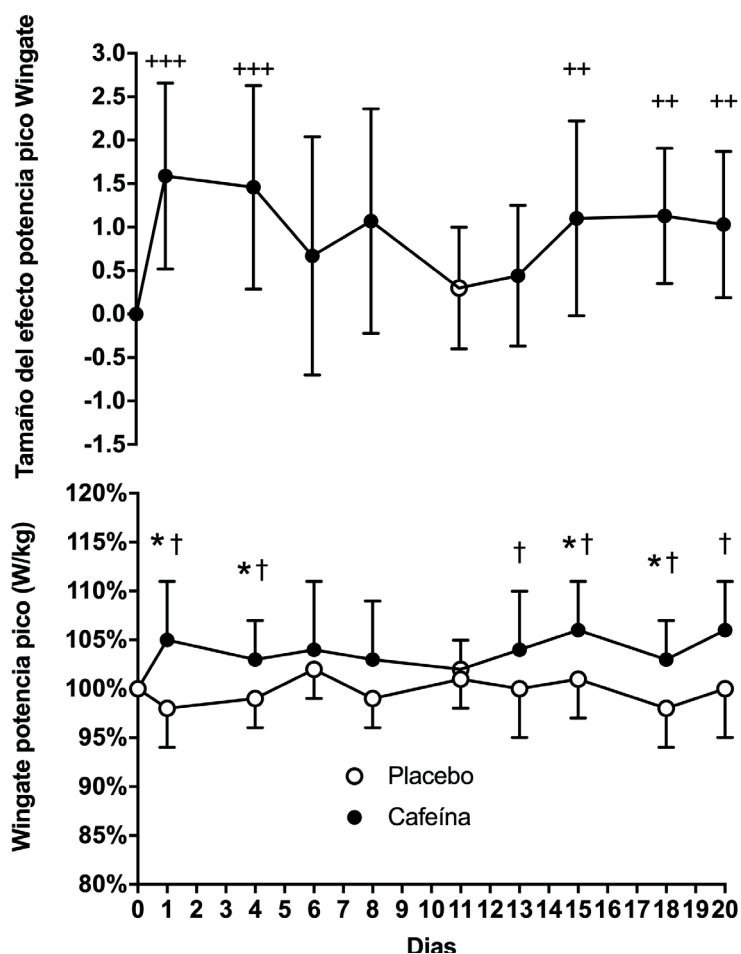


Figura 15.

Potencia máxima de ciclismo obtenida durante una versión adaptada de la prueba Wingate (sprint total de 15-s) con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.

El panel superior muestra el tamaño del efecto (intervalos de confianza de $\pm 90\%$) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm DS. Los datos se han normalizado con respecto a los valores obtenidos en el día 0 de cada tratamiento para proporcionar una mejor comparación del efecto ergogénico de la cafeína en las variables estudiadas. (*) Cafeína diferente al placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$.

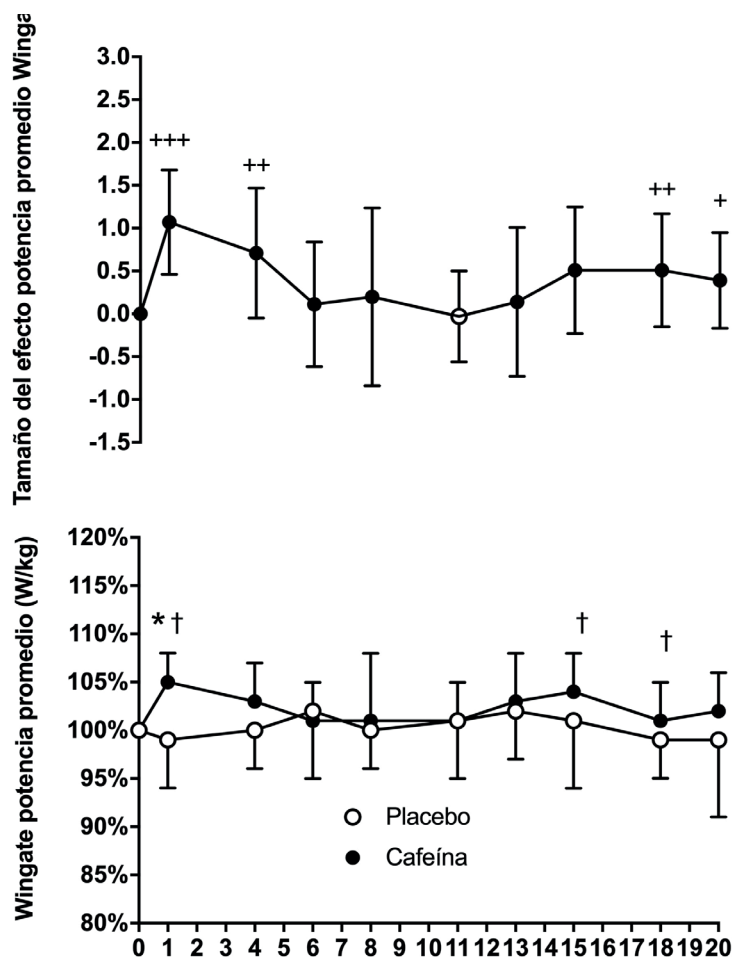


Figura 16.

Potencia media de ciclismo obtenida durante una versión adaptada de la prueba Wingate (sprint total de 15-s) con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.

El panel superior muestra el tamaño del efecto (intervalos de confianza de $\pm 90\%$) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm DS. Los datos se han normalizado con respecto a los valores obtenidos en el día 0 de cada tratamiento para proporcionar una mejor comparación del efecto ergogénico de la cafeína en las variables estudiadas. (*) Cafeína diferente al placebo para el mismo día, $P < 0.05$.

(†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de lactato en sangre después de la prueba de Wingate en los protocolos de cafeína frente a los de placebo, aunque la cafeína produjo una mayor concentración de lactato en sangre los días 1, 4, 13 y 15 con respecto al día 0 del protocolo de ingesta de cafeína (Tabla 6; $P < 0.05$). En esos mismos días, el tamaño del efecto de la ingestión de cafeína sobre el placebo fue de pequeño a moderado. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la potencia muscular percibida durante la prueba de Wingate en la cafeína frente al placebo con pequeños tamaños de efecto en las comparaciones por pares. Sin embargo, la ingesta de cafeína produjo una mayor potencia muscular percibida en el día 1, con respecto al día 0 del protocolo de la cafeína (Tabla 7; $P < 0.05$).

ESTUDIO 5: TOLERANCIA AL EFECTO DE LA CAFEÍNA EN EL SEGUNDO UMBRAL VENTILATORIO DURANTE UNA PRUEBA DE TEST INCREMENTAL DE CICLISMO

Objetivo

Determinar la evolución de la tolerancia al efecto ergogénico de la cafeína en el segundo umbral ventilatorio cuando la sustancia se ingiere durante 20 días consecutivos.

Materiales y métodos

Esta investigación comparte la muestra, el diseño y el protocolo experimental del estudio 4. Sin embargo, tiene como novedad que se presentan los datos obtenidos en el segundo umbral ventilatorio. Durante la prueba de ejercicio incremental, la ventilación pulmonar, la presión parcial final de oxígeno (PETO₂), la captación de oxígeno (VO₂), la presión parcial final de dióxido de carbono (PETCO₂) y la producción de dióxido de carbono (VCO₂) se midieron y registraron continuamente mediante un analizador respiración a respiración (Metalyzer 3B, Cortex, Alemania). Estas variables se utilizaron para calcular el segundo umbral ventilatorio (UV₂) utilizando los equivalentes ventilatorios para el oxígeno (VE/VO₂) y el dióxido de carbono (VE/VCO₂) y los cambios de presión parcial de acuerdo con el procedimiento combinado descrito por Gaskill et al., (2001).

La interpretación visual de cada gráfico fue realizada independientemente por dos investigadores capacitados que estaban cegados a los tratamientos que se estaban investigando. Estos investigadores establecieron el UV₂ como el punto que provocaba un aumento de la ventilación con respecto al VO₂ (es decir, ↑VE/VO₂) y el VCO₂ (es decir, ↑VE/VCO₂) mientras que la presión parcial de marea final de dióxido de carbono disminuía (↓PETCO₂). Con este protocolo, el descenso del PETCO₂, que comienza en el UV₂ es evidente hasta el final de la prueba (Lucia et al., 2000). En caso de desacuerdo entre los investigadores se buscó un tercer investigador (Coso et al., 2009). Una vez que se acordó el UV₂, se extrajeron para su análisis los datos de potencia, VO₂, frecuencia cardíaca y VE/VO₂ y el dióxido de carbono VE/VCO₂ en este punto, utilizando un promedio de los datos de los últimos 15-s de la carga de trabajo en el UV₂.

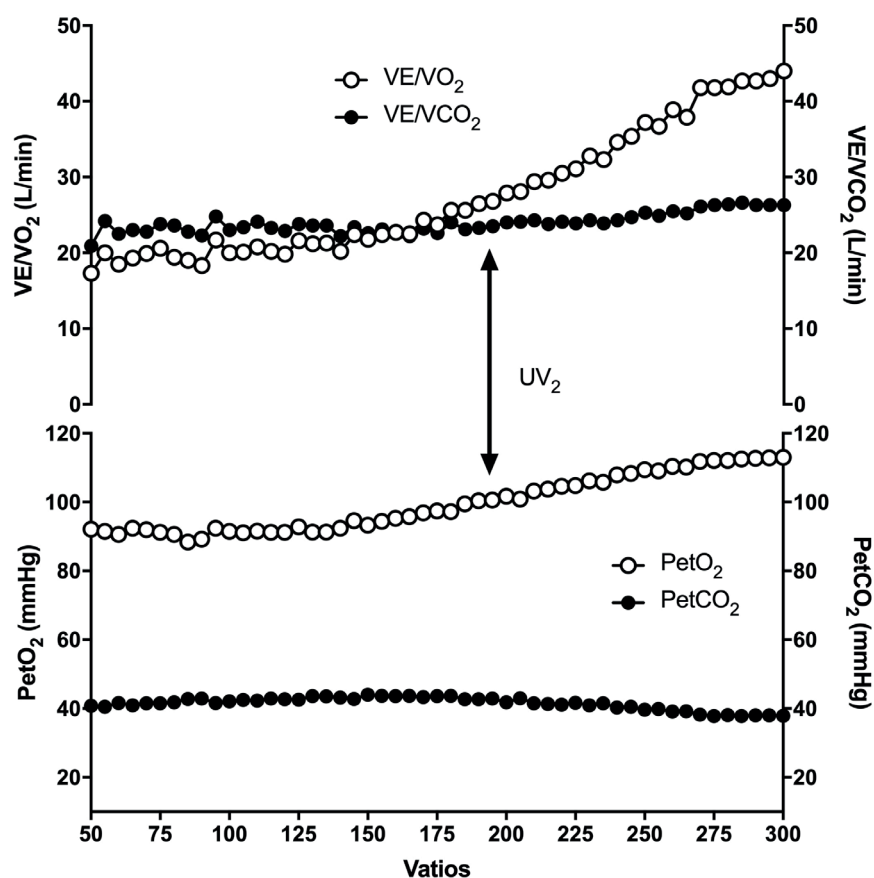


Figura 17.

Representación gráfica para la obtención del Umbral ventilatorio 2.

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS v 20.0 para el análisis estadístico. Inicialmente, se probó la existencia de una distribución normal para cada variable con la prueba de Shapiro-Wilk. Todas las variables presentaron una distribución normal y posteriormente se utilizaron estadísticas paramétricas. Además, el supuesto de esfericidad se comprobó con la prueba de Mauchly. Si esta suposición presentaba una probabilidad de $P < 0.05$, se utilizó la corrección de Greenhouse-Geisser. Realizamos un análisis bidireccional de la varianza (ANOVA) con medidas repetidas (sustancia x tiempo) en cada variable para determinar las diferencias en la comparación cafeína-placebo dentro de cada día de tratamiento y las diferencias respecto al día 0 dentro de cada tratamiento. En el caso de un valor F significativo en los ANOVA, las diferencias entre los grupos se identificaron con pruebas post-hoc de LSD. El nivel de significación se fijó en $P < 0.05$. El tamaño del efecto \pm 95% intervalos de confianza (IC) también se calculó en todas las comparaciones de cafeína-placebo dentro del mismo día de tratamiento

usando unidades de Cohen's d. La magnitud del tamaño del efecto se interpretó de la siguiente manera: menos de 0.2 = trivial; entre 0.2 y 0.6 = pequeño; entre 0.6 y 1.2 = moderado; entre 1.2 y 2.0 = grande; entre 2.0 y 4.0 = muy grande; más de 4.0 = extremadamente grande (Hopkins et al., 2009).

Resultados

El ANOVA de dos vías reveló efectos principales estadísticamente significativos de la sustancia ($F = 26.11$; $P < 0.01$), y el tiempo ($F = 1.99$; $P = 0.04$) en la potencia obtenida en UV_2 , aunque no hubo interacción entre estos dos factores ($F = 1.73$; $P = 0.09$). En el día 0, la potencia obtenida en el UV_2 fue similar entre el placebo y la cafeína (195 ± 27 vs 202 ± 18 W, respectivamente; $P = 0.27$). En el tratamiento de 20 días con placebo, la potencia en UV_2 fue mayor en el día 13 en comparación con el día 0 ($P = 0.02$), sin otras diferencias. En el tratamiento de 20 días con cafeína, los vatios correspondientes al UV_2 fue mayor en los días 1, 4 y 15 que en el día 0 ($P < 0.05$). Además, la carga de trabajo alcanzada en el UV_2 fue mayor con la cafeína que con el placebo en los días 1, 4, 6 y 15 ($P < 0.05$). El ES de la comparación cafeína-placebo fue moderado en el día 1, 4 y 6 y disminuyó a pequeño después (Figura 18).

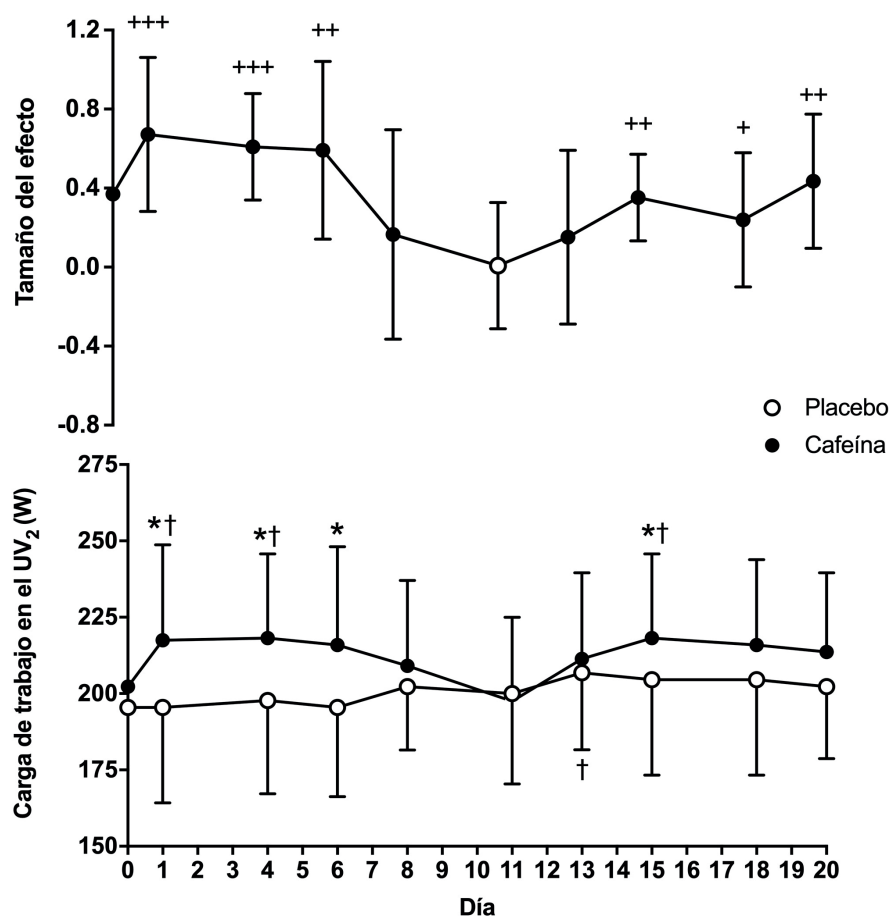


Figura 18.

Carga de trabajo (W) en el segundo umbral de ventilación (UV₂) durante una prueba de test incremental de ciclismo con la administración de 3mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra los tamaños de los efectos (intervalos de confianza del \pm 95%) para todas las comparaciones de puntos temporales entre la cafeína y el placebo. Los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia (>25%) fueron etiquetados como: (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm DS. (*) La cafeína es diferente al placebo para el mismo punto de tiempo en $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento a $P < 0.05$. Nota: En los días 0 y 11, tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ningún tratamiento.

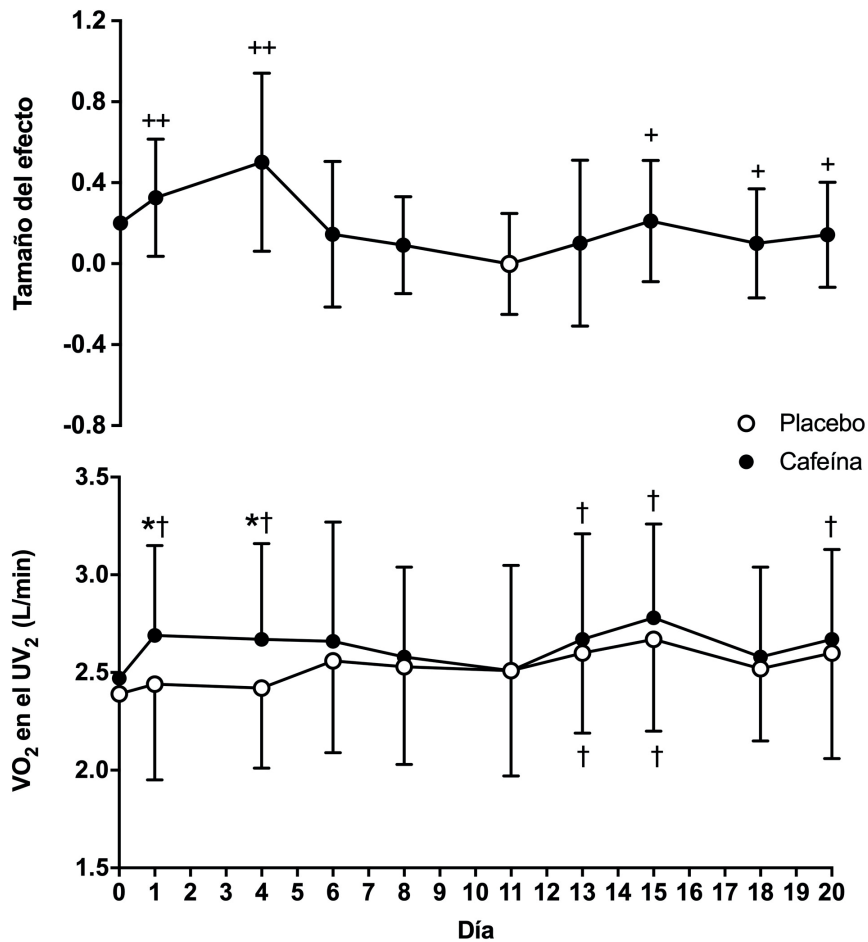


Figura 19.

Captación de oxígeno (VO_2) en el segundo umbral de ventilación (UV_2) durante una prueba de test incremental de ciclismo con la administración de 3mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra los tamaños de los efectos (intervalos de confianza del $\pm 95\%$) para todas las comparaciones de puntos temporales entre la cafeína y el placebo. Los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$) fueron etiquetados como: (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm DS. (*) La cafeína es diferente al placebo para el mismo punto de tiempo en $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento a $P < 0.05$. Nota: En los días 0 y 11, tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ningún tratamiento.

En el día 0, la frecuencia cardíaca en el UV_2 fue similar entre el placebo y la cafeína (153 ± 14 vs 158 ± 16 latidos/min, respectivamente; $P = 0.15$). En el tratamiento con placebo, no hubo diferencias en la frecuencia cardíaca en UV_2 durante todo el período de 20 días. De la misma manera, no hubo diferencias en la frecuencia cardíaca en UV_2 durante el tratamiento con cafeína. Sin embargo, la frecuencia cardíaca en UV_2 fue mayor con la cafeína que con el placebo en los días 1, 4 ($P < 0.05$). El ES de la comparación cafeína-placebo fue pequeña en el día 1, 4 y 6 y se volvió trivial después (Figura 20).

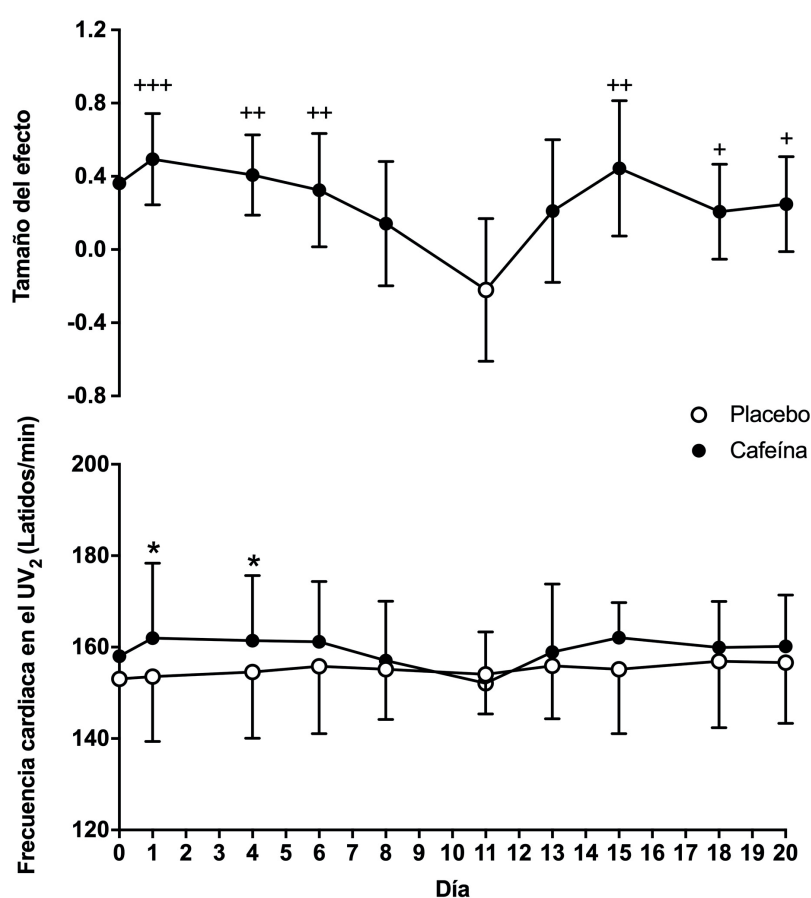


Figura 20.

Ritmo cardíaco en el segundo umbral de ventilación (UV_2) durante una prueba de test incremental de ciclismo con la administración de 3mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra los tamaños de los efectos (intervalos de confianza de $\pm 95\%$) para todas las comparaciones de puntos temporales entre la cafeína y el placebo. Los tamaños de los efectos con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$) fueron etiquetados como: (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. El panel inferior muestra los datos presentados como media \pm DS. (*) La cafeína es diferente al placebo para el mismo punto de tiempo en $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento a $P < 0.05$. Nota: En los días 0 y 11, tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ningún tratamiento.

El equivalente ventilatorio del O₂ en el UV₂ fue similar entre el placebo y la cafeína en el día 0 (Tabla 8, P= 0.17). No hubo diferencias en el equivalente ventilatorio del O₂ en el UV₂ durante el tratamiento con placebo. En el tratamiento con cafeína, el equivalente ventilatorio de O₂ en UV₂ fue mayor el día 4 que el día 0 (P < 0.05). El equivalente ventilatorio del O₂ en el UV₂ fue mayor en los días 4, 6, 13 y 15 con la cafeína que con el placebo en los días 1 y 4 (P < 0.05). En cuanto al equivalente ventilatorio de CO₂ en el UV₂, fue mayor en los días 15 y 20 con el placebo en comparación con el día 0 del mismo tratamiento (Tabla 8, P < 0.05). El equivalente ventilatorio de CO₂ en el UV₂ no cambió en los 20 días de tratamiento con cafeína, pero fue más alto con la cafeína que con el placebo en el día 1 (P < 0.05).

Tabla 8. Equivalente ventilatorio para el oxígeno (O₂) y para el dióxido de carbono (CO₂) en el segundo umbral ventilatorio (UV₂) durante una prueba de test incremental de ciclismo con la administración de 3mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos.

DÍA	Equivalente ventilatorio de O ₂ al UV ₂			Equivalente ventilatorio de O ₂ al UV ₂		
	PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO (±95% CI)	PLACEBO	CAFEÍNA	TAMAÑO DEL EFECTO (±95% CI)
0	28.2±3.2	29.9±3.5	0.5(-0.2/1.1)	24.4±2.1	25.8±2.2	0.4(-0.1/1.0)
1	29.8±4.8	30.6±3.9	0.2(-0.4/0.7)	25.1±2.6	27.2±3.7*	0.7(0.2/1.2)
4	29.0±2.5	32.8±4.1*†	1.3(0.5/2.1)	25.1±2.0	26.0±2.4	0.4(-0.3/1.1)
6	28.1±2.4	30.6±2.4*	0.9(0.3/1.4)	25.7±1.9	26.6±2.7	0.4(-0.3/1.1)
8	28.6±1.8	30.6±4.5	0.9(-0.2/2.1)	25.0±1.4	26.0±2.4	0.6(-0.4/1.6)
11	28.3±2.3	29.3±2.8	0.4(0.0/0.7)	25.1±1.9	25.4±1.5	0.1(-0.5/0.8)
13	28.2±2.2	30.5±2.6*	0.9(0.5/1.3)	25.7±1.5	26.6±1.7	0.5(-0.1/1.1)
15	28.0±3.1	30.9±2.5*	0.8(0.2/1.4)	26.5±2.6†	26.7±2.1	0.1(-0.2/0.4)
18	29.9±2.8	32.2±3.8	0.7(-0.1/1.4)	25.8±2.0	26.0±2.5	0.0(-0.4/0.4)
20	29.0±3.7	31.2±3.4	0.6(-0.2/1.1)	26.4±2.2†	26.2±2.0	0.1(-0.7/0.6)

Nota: Todas las variables fueron evaluadas con escalas de 1 a 10 puntos, donde 1 punto significaba una cantidad mínima de la variable y 10 puntos significaban una cantidad máxima de esa variable (5 puntos era el valor usado para indicar que no se sentía ninguna diferencia con un día normal). (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, P < 0.05. (†) Diferente del día "0" dentro del mismo tratamiento, P < 0.05. Nota: En los días "0" y "11", tanto el ensayo del placebo como el de la cafeína se realizaron sin la administración de ninguna cápsula.

ESTUDIO 6: CICLO DE TOLERANCIA A LOS EFECTOS ADVERSOS ASOCIADOS CON LA INGESTIÓN DE UNA DOSIS MODERADA DE CAFEÍNA

Objetivos

Describir los cambios inducidos por la cafeína en la presión arterial en reposo, la frecuencia cardíaca y en los efectos secundarios típicamente asociados con la ingesta de 20 días de cafeína.

Materiales y métodos

Esta metodología utilizó la muestra del estudio 5 y 6, pero debido al objetivo del estudio, las variables investigadas fueron diferentes durante el protocolo experimental respecto a los estudios anteriores. Entre ellas, el análisis de la presión arterial fue añadido mediante un reposo previo a las pruebas del test incremental anteriormente citado. En este periodo se midió la frecuencia cardíaca en reposo (H10, Polar, Finlandia) y la presión arterial sistólica y diastólica (M7 Comfort, Omron, Japón; por triplicado). Para el análisis se utilizó un promedio de tres mediciones de la presión arterial. De manera adicional, los procedimientos experimentales del día 11 fueron diferentes a los del resto de los días de medición tal y como se explicó en el estudio 5 de la presente Tesis Doctoral.

El día después de cada visita de prueba, los participantes completaron una encuesta en línea para calificar, en una escala de 1 a 10 puntos, sus sentimientos de nerviosismo, vigor e irritabilidad. En esta encuesta, también se pidió a los participantes que calificaran la magnitud de los síntomas, si los había, de dolor de cabeza, malestar gastrointestinal y dolor muscular y la magnitud de otros efectos secundarios como el insomnio y la diuresis. Esta misma encuesta se ha empleado anteriormente para evaluar el efecto de la ingestión aguda de cafeína en todas estas variables (Salinero et al., 2014). Se familiarizó a los participantes con la encuesta antes de su aplicación en el experimento y se les informó de que 1 punto significaba la cantidad mínima de la variable/sentimiento y 10 puntos la cantidad máxima de esa variable (1 punto era el valor utilizado para indicar que no se sentía diferente de un día normal).

Análisis estadístico: Los resultados de cada prueba fueron introducidos a ciegas en el paquete estadístico SPSS v 20.0 y analizados después. Los datos sobre la presión

arterial sistólica, la presión arterial diastólica y la frecuencia cardíaca en reposo se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (tratamiento × día). Cuando el ANOVA mostró un efecto significativo en el tratamiento, las diferencias en todas las comparaciones de pares de cafeína y placebo se evaluaron utilizando la prueba post-hoc de Tukey. Las diferencias en las variables autocalificadas se analizaron usando la prueba de rango firmado de Wilcoxon. El criterio de significación estadística en todas estas pruebas se fijó en $P < 0.05$. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. El tamaño del efecto también se calculó en todas las comparaciones por pares para permitir un enfoque de inferencia basado en la magnitud (Hopkins et al., 2009). Específicamente, se utilizó la estadística del tamaño del efecto \pm intervalo de confianza (IC) del 90% en los datos transformados en logaritmo. Se incluyó un descriptor cualitativo para representar la probabilidad de la diferencia de cafeína-placebo en cada variable y para cada día del ensayo experimental. Los rangos de probabilidad $<1\%$ indicaban casi con certeza que no había posibilidades de cambio; 1% a 5% , muy improbable; 5% a 25% , improbable; 25% a 75% , posible; 75% a 95% , probable; 95% a 99% , muy probable; $>99\%$, muy probable. Las diferencias se calificaron como poco claras cuando la probabilidad superaba $>5\%$ en ambas direcciones positiva/negativa. Los tamaños de los efectos se interpretaron de acuerdo con los siguientes rangos: <0.2 , trivial; $0.2-0.6$, pequeño; $0.6-1.2$, moderado; $1.2-2.0$, grande; $2.0-4.0$, muy grande y; >4.0 , extremadamente grande (Hopkins et al., 2009).

Resultados

La figura 21 muestra las fluctuaciones de la presión sanguínea sistólica durante los 20 días de tratamiento con cafeína y placebo. Específicamente, la presión sanguínea sistólica se mantuvo relativamente constante en $\sim 114 \pm 11$ mmHg durante todo el tratamiento con placebo. La ingestión de cafeína aumentó la presión arterial sistólica por encima del valor registrado con el placebo (efecto principal, $P = 0.003$). La comparación por pares mostró que la presión sanguínea sistólica era más alta con la cafeína en los días 1, 4 y 8 ($P < 0.05$), sin ninguna otra diferencia con la cafeína-placebo en el posterior análisis post-hoc. Curiosamente, la magnitud del efecto de la cafeína sobre la presión arterial sistólica disminuyó durante el período de tratamiento, y la probabilidad de este efecto cambió de muy probable en el día 1 a poco clara en el día 20. La presión arterial diastólica siguió un patrón similar al de la presión arterial sistólica; con el placebo, la presión arterial diastólica se mantuvo relativamente constante en $\sim 70 \pm 7$ mmHg durante todo el tratamiento, pero la cafeína aumentó la presión arterial diastólica (efecto principal, $P = 0.037$). Por otro lado, el análisis post-hoc reveló diferencias de cafeína-placebo en los días 4 y 8 ($P < 0.05$, figura 22). La magnitud del

efecto de la cafeína sobre la presión arterial diastólica disminuyó durante el período de tratamiento y su probabilidad cambió de probable en el día 1 a poco clara en el día 20. La ingestión de cafeína no afectó a la frecuencia cardíaca en reposo en ningún momento (efecto principal, $P = 0.239$) en comparación con la administración del placebo, mientras que la magnitud del efecto de la cafeína-placebo siempre estuvo entre 0.1 y 0.3 y la probabilidad no está clara en todas las comparaciones por pares (Tabla 9).

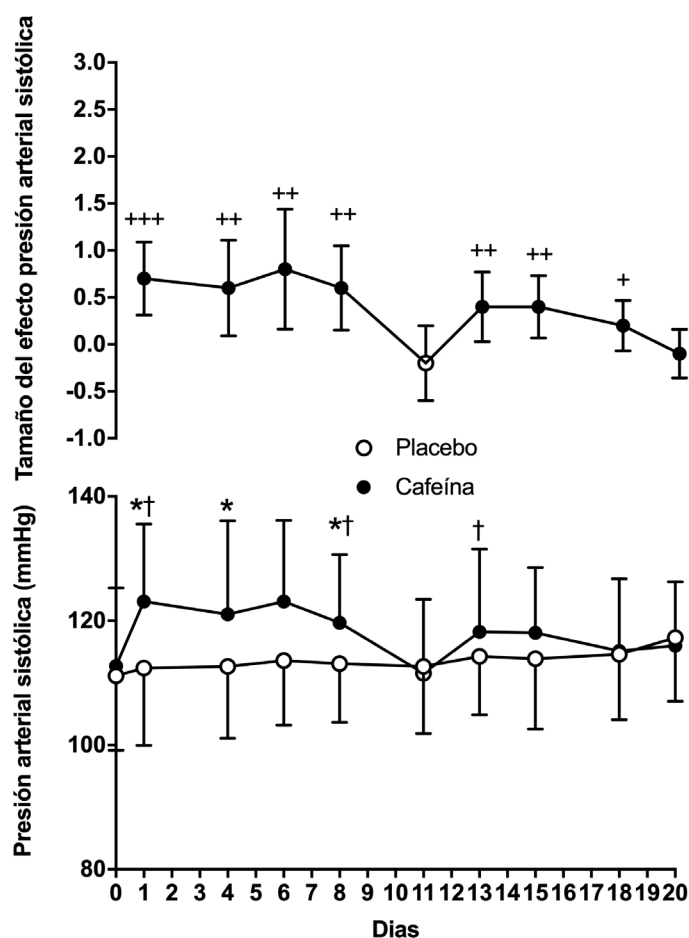


Figura 21.

Presión arterial sistólica con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (\pm 95% de intervalos de confianza) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños del efecto con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. Los datos del panel inferior se presentan como media \pm DS. (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$.

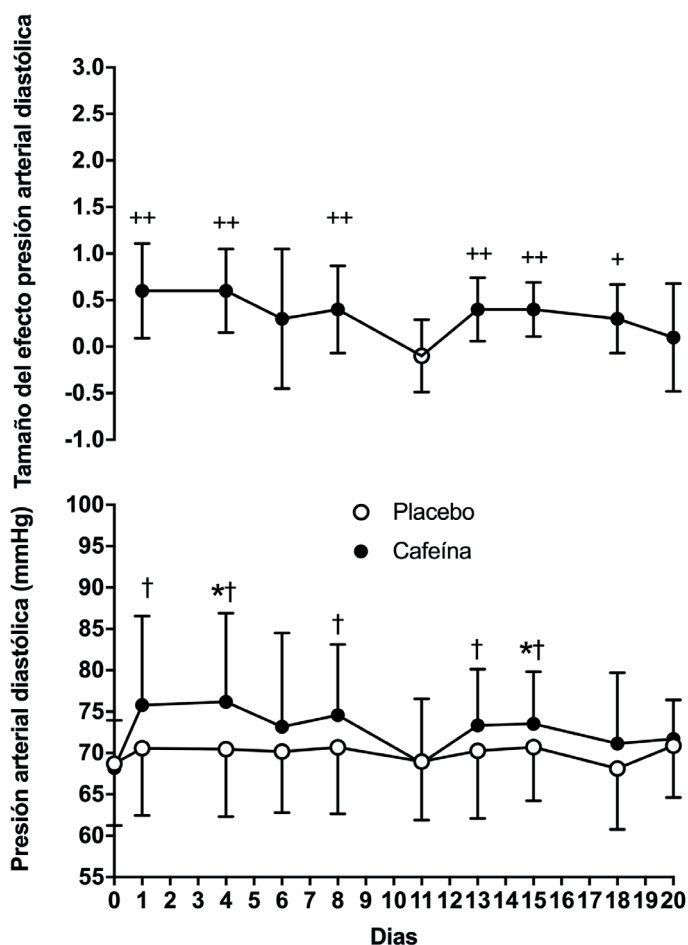


Figura 22.

Presión arterial diastólica con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (\pm 95% de intervalos de confianza) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños del efecto con una posible probabilidad de diferencia ($>25\%$): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. Los datos del panel inferior se presentan como media \pm DS. (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$. (†) Diferente del día 0 dentro del mismo tratamiento, $P < 0.05$.

En la figura 23 se muestran las sensaciones de nerviosismo autocalificados con la administración de cafeína sobre el placebo. La calificación del nerviosismo se mantuvo constante en $\sim 1.3 \pm 0.8$ puntos durante el tratamiento con placebo sin cambios entre los días. La cafeína incrementó los índices de nerviosismo sobre el placebo (efecto principal, $P = 0.022$), específicamente en las comparaciones por pares de los días 4, 6 y 13 ($P < 0.05$). La magnitud del efecto de la cafeína sobre el placebo en el nerviosismo autocalificado tendió a aumentar con la duración del tratamiento, aunque era

probable -más probable- en todas las comparaciones por pares. En comparación con el placebo, la cafeína también aumentó la sensación de vigor (efecto principal, $P = 0.008$), específicamente en las comparaciones por pares de los días 1, 4, 6, 13, 15 y 18 ($P < 0.05$). La magnitud del efecto de la cafeína-placebo sobre el vigor fue moderada y seguramente muy probable durante todo el tratamiento (figura 24).

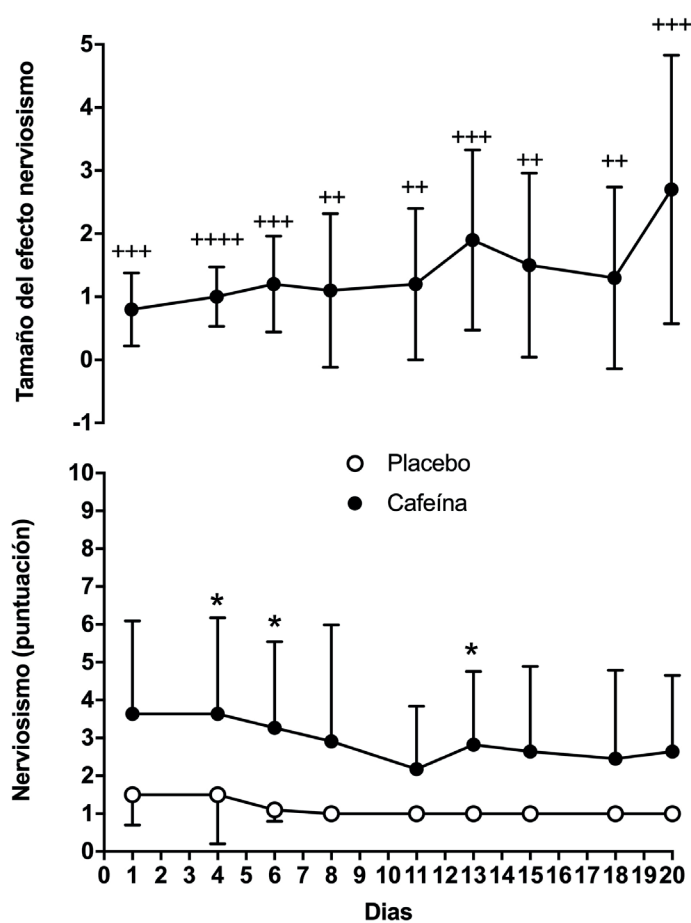


Figura 23.

Calificaciones autoinformadas de nerviosismo con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (\pm 95% de intervalos de confianza) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños del efecto con una posible probabilidad de diferencia (>25%): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. Los datos del panel inferior se presentan como media \pm DS. (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0,05$.

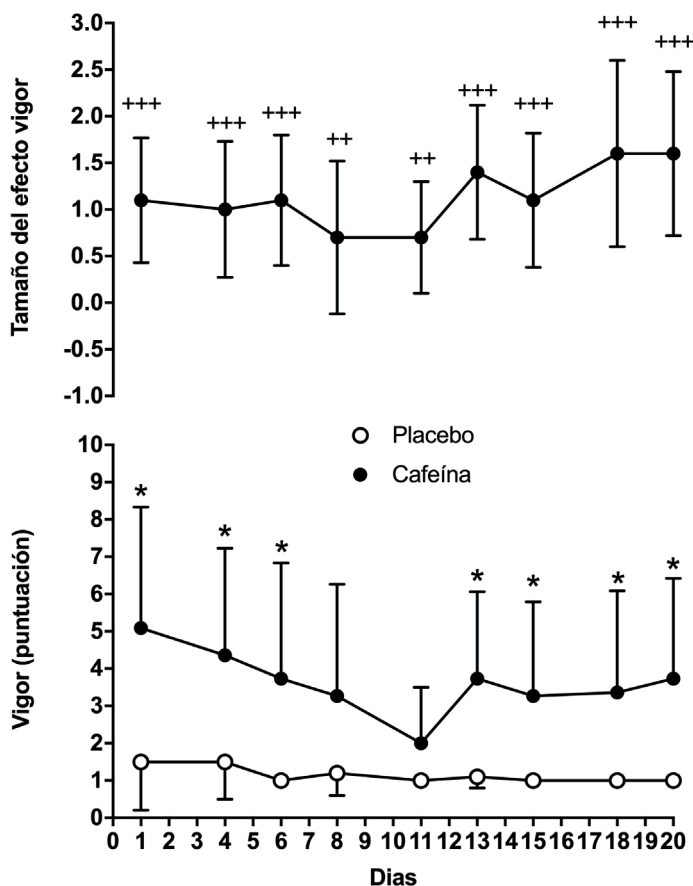


Figura 24.

Calificaciones autoinformadas de vigor con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos. El panel superior muestra el tamaño del efecto (\pm 95% de intervalos de confianza) para todas las comparaciones por pares. Sólo se clasifican los tamaños del efecto con una posible probabilidad de diferencia (>25%): (++++) más probable, (+++) muy probable, (++) probable, (+) posiblemente. Los datos del panel inferior se presentan como media \pm DS. (*) Cafeína diferente del placebo para el mismo día, $P < 0.05$.

La tabla 10 contiene información sobre los valores autocalificados de dolor de cabeza, malestar gastrointestinal y dolor muscular. Con el placebo, el dolor de cabeza se calificó como menos a 2 puntos durante todo el tratamiento, mientras que la ingestión de cafeína no afectó a las calificaciones del dolor de cabeza en ningún punto temporal (efecto principal, $P = 0.971$). Sin embargo, la cafeína incrementó las calificaciones del malestar gastrointestinal sobre el placebo (efecto principal, $P = 0.033$), y la comparación por pares reveló diferencias significativas entre los días 1 y 8 de la ingesta en $P < 0.05$. Los efectos de la cafeína para aumentar las molestias gastrointestinales fueron probablemente muy probables hasta el día 15 de la ingestión,

con efectos poco claros después. En cuanto a los dolores musculares, la cafeína sólo produjo efectos muy probables en los días 15 y 18 de la ingestión a $P < 0.05$, pero el efecto principal para esta variable no alcanzó significación estadística (efecto principal, $P = 0.174$).

En la tabla 11 se muestra información sobre la irritabilidad, el insomnio y la diuresis autocalificados durante los tratamientos con placebo y cafeína. En comparación con el placebo, la ingestión de cafeína produjo efectos poco claros sobre la irritabilidad durante los primeros 11 días de la ingestión, con posibles efectos posteriores (efecto principal, $P = 0.248$). En general, la cafeína aumentó los índices de insomnio en comparación con el placebo (efecto principal, $P = 0.041$), con una diferencia de pares identificada el día 13 de la ingestión ($P < 0.05$); los efectos de la cafeína sobre el insomnio fueron muy probables, posiblemente después de seis días de ingestión continua, y se mantuvieron con la misma probabilidad hasta el final del tratamiento. Finalmente, la cafeína indujo un efecto de diuresis muy probable durante todo el tratamiento (efecto principal, $P = 0.049$).

Tabla 9. Frecuencia cardíaca tras la ingestión de cafeína con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.

Frecuencia cardíaca en reposo			
DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	INFERENCIA CUALITATIVA
1	52 ± 8	53 ± 9	Improbable
4	52 ± 8	51 ± 9	Improbable
6	52 ± 8	50 ± 9	Improbable
8	51 ± 6	50 ± 9	Improbable
11	53 ± 9	53 ± 7	Improbable
13	55 ± 10	52 ± 9	Improbable
15	54 ± 10	51 ± 7	Improbable
18	52 ± 8	50 ± 8	Improbable
20	53 ± 7	50 ± 8	Improbable

Tabla 10. Dolor de cabeza, malestar gastrointestinal (GI) y dolor muscular con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.

Dolor de cabeza			
DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	INFERENCIA CUALITATIVA
1	1.0±0.0	1.2±0.4	Improbable
4	1.2±0.6	1.9±2.7	Improbable
6	1.8±1.9	1.6±1.3	Improbable
8	1.9±1.6	1.2±0.6	Improbable
11	1.3±0.9	1.2±0.6	Improbable
13	1.2±0.6	1.2±0.4	Improbable
15	1.1±0.3	1.1±0.3	Improbable
18	1.1±0.3	1.2±0.4	Improbable
20	1.1±0.3	1.2±0.4	Improbable

Dolor gastrointestinal			
DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	INFERENCIA CUALITATIVA
1	1.0±0.0	2.7±2.5*	Muy probable
4	1.0±0.0	2.8±3.1	Muy probable
6	1.6±1.8	2.6±2.8	Improbable
8	1.0±0.0	2.3±1.7*	Muy probable
11	1.0±0.0	2.3±2.5	Muy probable
13	1.3±0.9	2.4±2.7	Probable
15	1.1±0.3	2.4±2.5	Muy probable
18	1.2±0.6	1.8±2.1	Improbable
20	1.0±0.0	1.5±1.5	Improbable

Dolor muscular			
DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	INFERENCIA CUALITATIVA
1	1.5±1.0	1.9±2.1	Improbable
4	1.4±0.7	2.1±2.4	Improbable
6	2.0±2.5	2.1±2.2	Improbable
8	1.6±1.3	1.6±1.6	Improbable
11	1.0±0.0	1.7±1.6	Improbable
13	1.5±0.8	2.2±2.1	Improbable
15	1.0±0.0	2.3±2.2	Muy probable
18	1.5±1.5	2.5±2.8	Probable
20	1.6±1.8	2.5±2.8	Improbable

Nota: Todas las variables se evaluaron con escalas de 1 a 10 puntos, en las que 1 punto significaba la cantidad mínima de la variable y 10 puntos la cantidad máxima de esa variable (1 punto era el valor utilizado para indicar que no se sentía diferente de un día normal). (*) Cafeína diferente al placebo para el mismo día de la ingestión, $P < 0.05$.

Tabla 11. Irritabilidad, insomnio y diuresis respondidos, medidos con una escala de 1 a 10 puntos, con la administración de 3 mg/kg/día de cafeína o un placebo durante 20 días consecutivos.

Irritabilidad			
DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	INFERENCIA CUALITATIVA
1	1.1±0.3	1.4±0.9	Improbable
4	1.2±0.4	2.0±1.7	Improbable
6	1.6±2.1	1.8±2.1	Improbable
8	1.0±0.0	1.6±1.8	Improbable
11	1.0±0.0	1.2±0.6	Improbable
13	1.0±0.3	1.3±0.7	Probable
15	1.0±0.0	1.3±0.7	Improbable
18	1.4±1.2	1.8±1.8	Posible
20	1.4±2.4	2.2±2.4	Posible

Insomnio			
DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	INFERENCIA CUALITATIVA
1	2.0±2.1	2.8±2.9	Improbable
4	2.2±2.4	3.5±3.3	Improbable
6	1.8±2.1	3.6±3.4	Probable
8	1.9±1.6	3.0±2.5	Probable
11	2.4±2.4	3.3±3.1	Improbable
13	1.5±0.9	3.1±2.5*	Muy probable
15	2.1±2.2	2.3±2.0	Posible
18	1.7±1.5	3.1±2.5	Probable
20	2.6±2.8	2.2±2.8	Posible

Diuresis			
DÍA	PLACEBO	CAFEÍNA	INFERENCIA CUALITATIVA
1	1.0±0.0	2.2±1.7	Muy probable
4	1.0±0.0	2.3±2.4	Muy probable
6	1.2±0.6	3.3±2.9	Muy probable
8	1.2±0.6	2.8±2.8	Probable
11	1.3±0.7	1.8±1.8	Improbable
13	1.1±0.3	2.2±2.0	Probable
15	1.1±0.3	2.0±2.0	Probable
18	1.2±0.6	2.2±1.7	Probable
20	1.1±0.3	2.2±2.0	Probable

Nota: Todas las variables se evaluaron con escalas de 1 a 10 puntos, en las que 1 punto significaba la cantidad mínima de la variable y 10 puntos la cantidad máxima de esa variable (1 punto era el valor utilizado para indicar que no se sentía diferente de un día normal). (*) Cafeína diferente al placebo para el mismo día de la ingestión, $P < 0.05$.

ESTUDIO 7: REFUTAR EL MITO DE LA FALTA DE RESPUESTA A LOS EFECTOS ERGOGÉNICOS DE LA INGESTIÓN DE CAFEÍNA

Objetivos

Analizar el efecto individual de la cafeína en respondedores y no respondedores mediante una metodología de medidas repetidas.

Materiales y métodos

Este sub-análisis se realizó con la metodología y con todos los datos tomados en el estudio 4, 5 y 6, con el mismo protocolo y diseño experimental. Lo único que cambió fue la manera de representar y analizar los resultados. Estos fueron representados como un análisis individualizado de los 11 sujetos que participaron en el proceso experimental con los datos máximo del trabajo realizado durante el test incremental hasta la fatiga, el test anaeróbico de Wingate 15-s, y la presión arterial sistólica y diastólica. Toda esta información fue obtenida de los datos recolectados de los 8 días donde hicieron las pruebas cuando ingirieron cafeína (i.e 1,4,6,8,13,15,18,20), sin tomar el dato del día 11, ya que como se comentó en los anteriores estudios, fue el día control.

Resultados

La figura 25 presenta diagramas individuales de caja y bigote para los cambios inducidos por la ingesta de cafeína, sobre la ingesta de un placebo. La variable analizada en la figura representa la potencia de ciclo obtenida durante el test incremental (W_{max}) y la potencia media de ciclo obtenida durante la prueba Wingate de 15-s. Esta figura es un claro ejemplo de la variabilidad interindividual en respuesta a la ingestión de cafeína con una ergogenicidad diversa inducida por la cafeína entre los individuos. La figura se organizó de manera decreciente en cuanto a la ergogenicidad de izquierda a derecha, con el participante que mostró la mayor respuesta a los efectos ergogénicos de la cafeína a la izquierda (sujeto 1 = $9.0 \pm 3.6\%$ y $2.3 \pm 1.4\%$ para la potencia de ciclo W_{max} y Wingate, respectivamente) al individuo con la menor respuesta a la derecha (sujeto 11 = $0.6 \pm 6.3\%$ y $1.6 \pm 4.2\%$ para la potencia de ciclo W_{max} y Wingate, respectivamente).

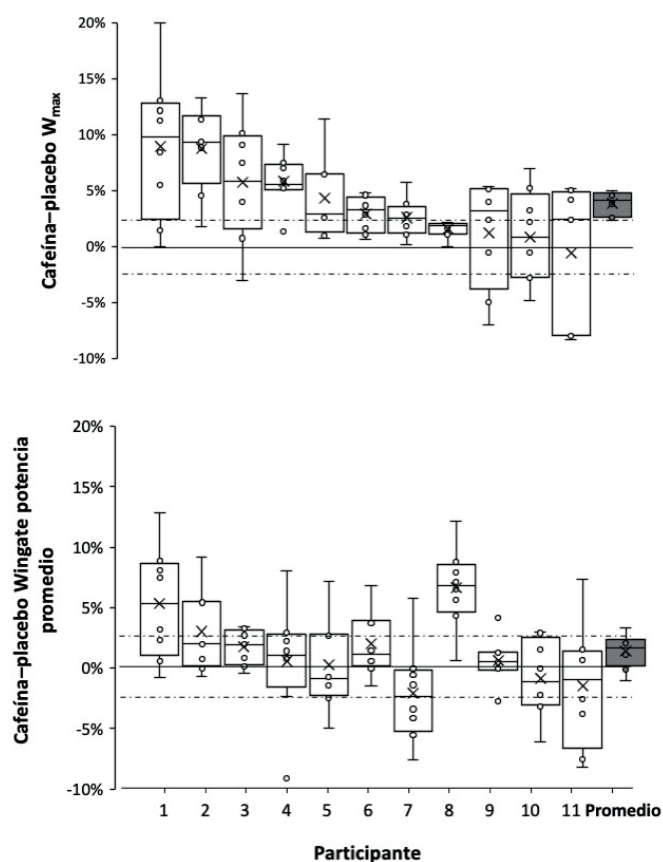


Figura 25.

Gráficos de caja y bigote para los efectos ergogénicos de 3 mg/kg de cafeína en la potencia de la bicicleta durante una prueba de test incremental (panel superior) y durante una prueba Wingate 15-s (panel inferior). La cafeína se comparó con un placebo en ocho ocasiones diferentes y cada gráfico representa los resultados de estas ocho comparaciones de cafeína y placebo para cada participante. “Promedio” representa los valores medios de los 11 participantes. La cruz representa el valor medio, mientras que las líneas inferior, media y superior del recuadro representan el percentil 25, 50 y 75% para cada individuo. Los bigotes representan los valores más bajos y más altos (rango).

La figura 26 muestra los datos individuales sobre los cambios inducidos por la cafeína en la presión arterial sistólica y diastólica en reposo, medidos antes del ejercicio, variable que también se emplea para categorizar las respuestas individuales a la ingestión aguda de cafeína. Como ocurre con el efecto ergogénico de la cafeína, los resultados de la cafeína en la presión arterial tuvieron una gran variabilidad inter e intra-individual. Sin embargo, los participantes con mayor respuesta a los efectos cardiovasculares de la cafeína fueron los que menos respondieron a los efectos ergogénicos de la cafeína (con la excepción del sujeto 5).

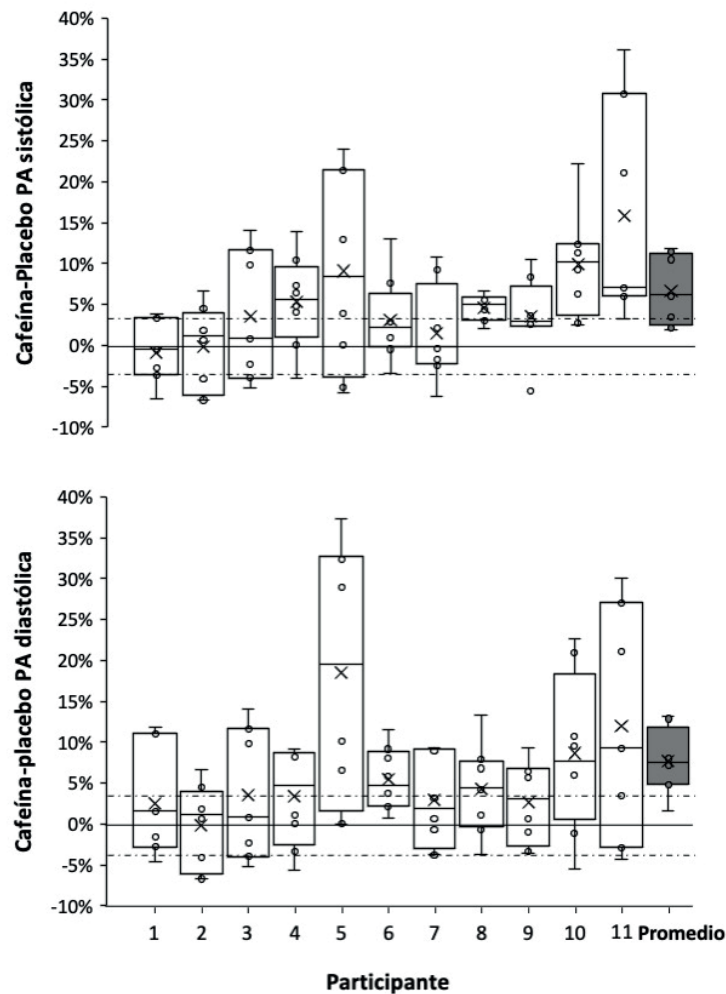


Figura 26.

Gráficos de caja y bigote para los efectos de 3 mg/kg de cafeína en la presión arterial sistólica (panel superior) y diastólica (panel inferior) en reposo. La cafeína se comparó con un placebo en ocho ocasiones diferentes y cada gráfico representa los resultados de estas ocho comparaciones de cafeína y placebo para cada participante. “Promedio” representa los valores medios de los 11 participantes. La cruz representa el valor medio, mientras que las líneas inferior, media y superior del recuadro representan el percentil 25, 50 y 75% para cada individuo. Los bigotes representan los valores más bajos y altos (rango).

En la figura 27 se muestra la relación entre las respuestas ergogénicas y cardiovasculares a la ingestión de cafeína. Curiosamente, los cambios inducidos por la ingesta de cafeína en la presión arterial sistólica y diastólica se relacionaron negativamente con la ergogenicidad de la cafeína en el rendimiento de los ciclos W_{\max} y Wingate.

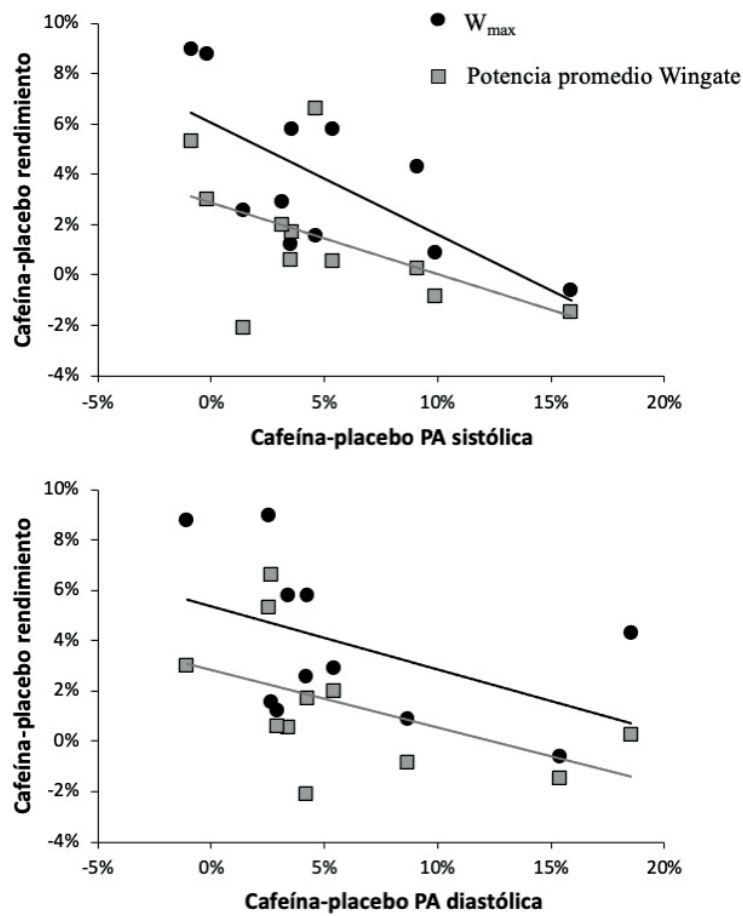


Figura 27.

Relaciones entre el efecto ergogénico de la cafeína y la presión arterial sistólica (panel superior) y diastólica (panel inferior) El efecto ergogénico de la cafeína se obtuvo midiendo la potencia máxima de los ciclos durante una prueba de test incremental (W_{max}) y durante una prueba Wingate de 15- La cafeína se comparó con un placebo en 8 ocasiones diferentes y cada punto representa un promedio de estas 8 comparaciones de cafeína y placebo para cada participante.



DISCUSIÓN

Beneficios ergogénicos de la cafeína tras una ingesta aguda y su habituación tras una ingesta continuada

Todas las investigaciones enfocadas al rendimiento deportivo mostradas en esta Tesis Doctoral presentaron ergogenicidad en lo que, al ejercicio aeróbico, anaeróbico y su transición respecta. Todos los resultados obtenidos coinciden con otras investigaciones en que el uso de la cafeína mejora el rendimiento deportivo aeróbico y anaeróbico (Grgic et al., 2019; Shen et al., 2019; Southward, Rutherford-Markwick, & Ali, 2018), además de considerarse una estrategia efectiva y muy usada por una gran cantidad de atletas de alto nivel (Aguilar-Navarro et al., 2019; Del Coso et al., 2011; Van Thuyne & Delbeke, 2006).

El estudio 1 presentó efectos positivos tras la ingesta de cafeína respecto a los W_{\max} resultando un $5.2 \pm 3.8\%$ más que en la condición de placebo. Además, estos efectos positivos también se encontraron en el $VO_{2\max}$ (Figura 6). Por otro lado, en el estudio 5 los valores de referencia (día 0) fueron similares en todas las variables de rendimiento (i.e W_{\max} , $VO_{2\max}$) de ambos protocolos. También, cuando se administró cafeína presentó un incremento durante los primeros 15 días en los vatios comparado con la administración diaria de placebo y respecto al día 0 (Figura 13 y 14). Estos datos contrastan con los beneficios de la ingesta de cafeína en pruebas de ciclismo de resistencia de alta intensidad, los cuales han sido reportados en la literatura a través de investigaciones originales (Silveira et al., 2018; Skinner et al., 2019) y meta-análisis (Mike Doherty & Smith, 2004; Shen et al., 2019; Southward, Rutherford-Markwick, & Ali, 2018). Así mismo, la extensa literatura científica sugiere que la magnitud de la ergogenicidad de la cafeína es típicamente efectiva en los test incrementales, pero, curiosamente es más efectiva en las investigaciones que utilizaron protocolos de resistencia de tiempo hasta el agotamiento (Mike Doherty & Smith, 2004; Shen et al., 2019). Además, en investigaciones anteriores se especula que el efecto de la cafeína en el rendimiento de resistencia es de magnitud similar en hombres y mujeres (Skinner et al., 2019), lo que se refuerza con la información aportada en nuestras investigaciones dado que el cohorte utilizado en los estudios de tesis doctoral son heterogéneos.

Aunque el efecto en el rendimiento aeróbico es claro, el efecto de la cafeína en el umbral anaeróbico tiene menos evidencia científica. En el estudio 5, los participantes en el primer día de ingesta de 3 mg/kg de cafeína, generaron un aumentó en los vatios

obtenidos (W) en el UV_2 en un $7.7 \pm 9.7\%$ (figura 18) en comparación con la ingesta de un placebo. Esta información sugiere que la ingesta aguda de cafeína tiene la capacidad de aumentar la carga de trabajo absoluta alcanzada en el UV_2 durante una prueba de test incremental de ciclismo, lo que puede explicar el efecto de mejora del rendimiento de este estimulante durante el ejercicio aeróbico de intensidad submáxima. Nuestros resultados podrían justificarse, dado que la ingesta aguda de cafeína tiene el potencial de aumentar la captación de oxígeno en el umbral ventilatorio (7 mg/kg) (Berry et al., 1991); reduce la acumulación de lactato en la sangre para la misma intensidad de ejercicio (10 y 15 mg/kg) (McNaughton, 1987); incrementa el tiempo hasta el agotamiento a una intensidad un 10% inferior al umbral anaeróbico (5 mg/kg) (Denadai & Denadai, 1998) y aumenta la respuesta ventilatoria para una determinada cantidad de CO_2 producida durante el ejercicio (650 mg de cafeína) (D'Urzo et al., 1990). Todos estos hallazgos apuntan a un beneficio ergogénico de la cafeína aguda para mejorar el rendimiento cuando se hace ejercicio a una intensidad cercana al umbral anaeróbico. Sin embargo, hasta donde sabemos, esta Tesis Doctoral presenta la primera investigación que encuentra un aumento en la intensidad del ejercicio que permite el UV_2 con una dosis moderada de cafeína (es decir, 3 mg/kg) cuando se ingiere de forma aguda. La cafeína también produce un efecto respiratorio que aumenta la ventilación durante el ejercicio de intensidad submáxima (Karapetian et al., 2012; L. L. Spriet et al., 1992). Esto puede permitir un mayor mantenimiento del pH muscular mediante la amortiguación del H^+ y la eliminación del CO_2 no metabólico por la respiración (Péronnet & Aguilaniu, 2006). Este mecanismo se encontró en la investigación en el estudio 5, ya que el equivalente ventilatorio de CO_2 en UV_2 con cafeína era más alto que con el placebo (tabla 8). Por último, estos resultados podrían asociarse con los valores obtenidos en la saturación de oxígeno del estudio 1, ya que podría retrasar el metabolismo anaeróbico durante un ejercicio incremental, permitiendo una mayor intensidad de ejercicio en el punto de transición aeróbico-anaeróbico. Por lo tanto, dados los resultados de todas las investigaciones al respecto, apoyan la conclusión de que la ingesta aguda de cafeína aumenta la carga de trabajo en el UV_2 .

Por otro lado, respecto al efecto en un test anaeróbico de Wingate, un meta-análisis reciente que reunió los resultados de 18 estudios informó que eran moderadamente superiores después de la ingesta de cafeína comparado con placebo, tanto a potencia máxima como a potencia media (3 y 4% respectivamente) (Grgic, 2018b). Sin embargo, la ingesta de cafeína y esta prueba anaeróbica siempre se han relacionado con la prueba de 30 segundos. Sólo un estudio y dos estudios en la presente Tesis Doctoral informaron sobre la prueba anaeróbica de 15-s Wingate. Lara, Gutiérrez-Hellín, et al., (2020) investigaron el efecto de la ingesta aguda de cafeína durante el ciclo menstrual

de las mujeres en un test anaeróbico Wingate de 15-s, administrando cafeína durante las diferentes fases del ciclo menstrual. Analizando específicamente los efectos de la cafeína en la fase lútea media, ésta aumentó la potencia máxima de $3.6 \pm 2.9\%$, y, por consiguiente, la potencia media un $2.4 \pm 2.1\%$. Aunque los resultados respecto a este test anaeróbico son novedosos y confirman la capacidad de la cafeína para incrementar el trabajo producido, tanto en el estudio 2 como en el estudio 4 (figuras 7, 8, 15 y 16), los resultados en el test Wingate de 15-s no se han mostrado sólidos ya que todos los estudios que han asociado la ingesta de la sustancia y un test de ciclismo anaeróbico lo han hecho con un test anaeróbico de Wingate de 30 segundos (Grgic, 2018b). Por lo tanto, se debería seguir investigando acerca de test anaeróbicos en cicloergómetro y efectos de la cafeína.

A pesar de toda esta información sobre la capacidad ergogénica de la cafeína, las pruebas que objetivan la tolerancia a los efectos estimulantes de la sustancia en los seres humanos no son concluyentes. Se ha especulado durante mucho tiempo sobre la tolerancia al beneficio ergogénico de la cafeína con la ingestión crónica (Sökmen et al., 2008), pero recientemente se han aportado pruebas con investigaciones controladas (R. Beaumont et al., 2017; Wilk et al., 2019). Respecto a nuestros resultados, los valores máximos y submáximos en los estudios 4 y 5 han demostrado una progresiva tolerancia respecto al día previo mostrado mediante la disminución de la magnitud del efecto en una ingesta diaria, sugiriendo el efecto máximo el primer día de ingesta. Ha sido reportado que en variables del rendimiento cognitivo, la administración de cafeína mejoró igualmente los resultados de los consumidores habituales y no consumidores de cafeína, incluso cuando se comparó con consumidores moderados (Attwood et al., 2007; Haskell et al., 2005). En otras investigaciones se ha demostrado que tanto en dosis altas (130-300 mg/día), como bajas (40-50 mg/día) podría reducirse la eficacia tras una ingesta continuada (Bell & McLellan, 2002; Evans et al., 2018). De forma similar, ocurre cuando la dosis es superior a 300 mg (Dodd et al., 1991; Gonçalves et al., 2017; Irwin et al., 2011; Tarnopolsky & Cupido, 2000). Además, se ha encontrado también una tolerancia progresiva a los efectos ergogénicos en los individuos que consumen 1.5-3.0 mg/kg/día de cafeína durante 28 días consecutivos (R. Beaumont et al., 2017). Es probable que las diferencias en los protocolos de investigación elegidos para estudiar esta cuestión, concretamente, el uso de personas con diferentes ingestas diarias y períodos de habituación a la cafeína, hayan contribuido a la disparidad de resultados. Sin embargo, investigaciones anteriores sugieren que la cafeína puede ser ergogénica incluso después de la habituación a ella. Con las pruebas actuales en la presente tesis, parece más claro que la ingesta crónica de cafeína, en una dosis de 3 mg/kg/día, produce tolerancia a los beneficios obtenidos con la

cafeína durante el ejercicio. Curiosamente, la cafeína sigue produciendo un efecto no significativo en la carga de trabajo alcanzada en el UV_2 (figura 18) y en el VO_{2max} (figura 19), mientras que el tamaño del efecto de la comparación entre la cafeína y el placebo por pares sigue siendo pequeño o moderado después de 20 días de ingestión consecutiva.

Todas las investigaciones en esta Tesis Doctoral presentan resultados ergogénicos cuando la cafeína es ingerida tanto en test aeróbico, como en el anaeróbico, o en el punto de transición entre ambos reforzándose los paradigmas fundamentados en la relación entre la cafeína y el rendimiento deportivo. La presente Tesis Doctoral tiene un factor diferencial ya que fue utilizada una metodología cruzada respecto a las investigaciones discutidas anteriormente. Esto aporta datos sólidos en lo que la ergogenicidad respecta, dado que los participantes actuaron como su propio control.

Mecanismos efectores de la ergogenicidad de la cafeína y su habituación

Como ha sido introducido en el marco teórico, el beneficio aportado por la cafeína respecto al rendimiento deportivo viene mediado por el efecto que tiene la sustancia en el SNC. El mecanismo principal viene dado por la afinidad al bloquear los receptores de la adenosina debido a la similar forma molecular a la que tiene la sustancia, siendo el efecto de la sustancia dependiente del subtipo de receptor bloqueado. Después de una ingestión aguda, la cafeína se absorbe rápidamente, y como resultado de su naturaleza lipofílica, pasa a través de todas las membranas biológicas, incluyendo la barrera hematoencefálica (McCall et al., 1982). Existe un amplio consenso científico para considerar el papel antagónico de la cafeína como el principal mecanismo que subyace a sus efectos ergogénicos, principalmente debido a sus interacciones con los receptores de adenosina A_{1} , A_{2A} y A_{2B} en el sistema nervioso central (Fredholm et al., 2017). La cafeína también puede ejercer efectos durante el ejercicio submáximo a través de una mayor liberación de epinefrina, provocando la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo generando una mayor dependencia del uso de los lípidos como combustible (Terry E. Graham et al., 2000b, 2008), y además como en los resultados obtenidos en el estudio 1, el aumento de la saturación de oxígeno de los músculos (figura 5)

El incremento de la oxigenación muscular tras la ingesta de cafeína presenta un mecanismo de acción adicional que podría ayudar a comprender el efecto ergogénico de en el ejercicio de resistencia. En la prueba con la ingesta de cafeína, la saturación de oxígeno del músculo se incrementó en un 30-60% VO_{2pico} (figura 5). Aunque la significación estadística de este efecto desapareció a mayores cargas de trabajo, hubo un efecto principal de la sustancia en la saturación de oxígeno del músculo cuando fue ingerida, que indicaba una mayor disponibilidad de oxígeno en el músculo ejercitado. Mientras que el entrenamiento de resistencia produce habitualmente una mayor utilización del oxígeno en el músculo, lo que se traduce en una menor saturación de oxígeno muscular (Kime et al., 2016), la ingesta de cafeína produjo una mayor saturación de oxígeno muscular, lo que reflejó un mayor suministro de oxígeno en sangre al músculo que se estaba ejercitando. El punto final de la saturación de oxígeno muscular, obtenido en el momento de la fatiga volitiva, fue similar en los ensayos con cafeína y con placebo, a pesar de que la carga de trabajo fue significativamente mayor con la cafeína, lo que sugiere que el “margen” de una

mejor oxigenación tisular debido a la ingesta de cafeína permitió a los participantes realizar ciclos más largos y con una mayor intensidad de ejercicio cuando ésta fue ingerida. Aunque las causas de la mayor saturación de oxígeno muscular con cafeína no son evidentes a partir de nuestros datos, los valores inalterados de la ventilación pulmonar, la presión parcial de oxígeno y el VO_2 en las cargas de trabajo submáximas sugieren que la carga de oxígeno a nivel alveolar y la capacidad oxidativa de los músculos que realizan el ejercicio no se modificaron con este estimulante (Figura 6). Si es probable que estos dos factores no se modificaran con la ingestión de cafeína, la hipótesis alternativa para el proceso fisiológico que induce una mayor saturación de oxígeno en el músculo podría estar relacionada con una mejora del flujo sanguíneo local en la musculatura ejercitada. De hecho, esta teoría tiene apoyo científico debido a los potenciales efectos de vasodilatación de la cafeína a nivel endotelial (Umemura et al., 2006) y en las células del músculo liso (Echeverri et al., 2010), o indirectamente a través del aumento de la concentración de adenosina una vez que la cafeína bloquea sus receptores en el cerebro (Ballard, 2014).

De manera opuesta, este efecto no ocurrió en la prueba anaeróbica de 15-s de Wingate (estudio 2, figura 8). Quizás, debido a que sea una prueba donde el aporte de oxígeno no es el mecanismo principal para mejorar el rendimiento, pueda ser resultante de un aporte de oxígeno similar con ambos ensayos. A pesar de que la cafeína podría inducir una mayor saturación de oxígeno a intensidades bajas, como anteriormente discutimos (estudio 1), con intensidades donde se solicita una respuesta contráctil muscular rápida, y reclutamiento de fibras altas no parece afectar en la oxigenación tisular local según nuestros resultados en el estudio 2 (figura 8). Por lo tanto, los efectos ergogénicos de la cafeína en la prueba anaeróbica Wingate de 15-s podrían estar mediados directamente por el bloqueo de los receptores de adenosina en el cerebro (Meeusen et al., 2013). Este mecanismo incrementaría el ratio del impulso nervioso, y la efectividad de la sustancia para mejorar el gradiente electroquímico para la bomba de sodio y potasio intramuscular induciendo una mayor velocidad contráctil en un ejercicio, solicitando una rápida respuesta muscular, y sumado al aumento de la excitabilidad induciría a un mayor reclutamiento de fibras rápidas (figura 7, panel superior)(J. K. Davis & Green, 2009), explicando la diferencia en los primeros segundos de la prueba. Consecuentemente, el incremento del trabajo realizado en la prueba podría explicar el efecto sobre la concentración de lactato en la sangre tomado 1 minuto después del esfuerzo (figura 7). Tal vez, el aumento en la producción de trabajo al inicio del test cuando los sujetos ingirieron cafeína, además del efecto analgésico asociado a la sustancia por la posible liberación de adrenalina durante la prueba (Greer et al., 1998), podrían generar un aumento de la

concentración de lactato en la sangre impidiendo la capacidad de la musculatura de tamponamiento durante el esfuerzo (J. K. Davis & Green, 2009).

Respecto a los efectos ergogénicos de la cafeína ingerida crónicamente, donde los resultados en los estudios 4,5, y 6 de esta Tesis Doctoral y dada la magnitud del efecto tras una respuesta ergogénica aguda el primer día de ingesta, se produce una disminución de manera progresiva de los efectos dando como resultado una tolerancia a la sustancia. Este concepto se ha basado en investigaciones con roedores que informaron de la capacidad de la cafeína para bloquear los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} , y del aumento del número de receptores de adenosina en los tejidos neurales y vasculares del cerebro con el consumo regular (Chou et al., 1985; Fredholm, 1982). Investigaciones más recientes han demostrado que la tolerancia a la cafeína podría estar impulsada por alteraciones de la expresión génica en el cuerpo estriado, mientras que los cambios en el metabolismo de la cafeína inducidos tras el consumo de la sustancia a largo plazo no pueden explicar el desarrollo de la tolerancia a la cafeína (Svenningsson et al., 1999). Toda esta información sugiere que la ingesta diaria de cafeína da lugar a una mayor probabilidad de que la sustancia se una a los receptores de adenosina recientemente creados, reduciendo progresivamente la acción de bloqueo de la adenosina de la cafeína, junto con cambios adaptativos en la expresión genética que en última instancia conducen al desarrollo de la tolerancia locomotora.

Por otro lado, se cree que el efecto de la cafeína en la presión sanguínea está mediado principalmente por la elevación de la concentración sérica de catecolaminas (Robertson et al., 1981), aunque el aumento de la resistencia vascular periférica inducida por la cafeína en el músculo liso vascular también podría desempeñar una función en el aumento de la presión arterial (Echeverri et al., 2010). Dado que el aumento de los niveles plasmáticos de las hormonas del estrés inducido por la cafeína se reduce progresivamente con la ingestión crónica (Robertson et al., 1981), se espera entonces una reducción similar y concomitante del efecto de la cafeína en la presión arterial. Además, la regulación a la baja de los receptores adrenérgicos α y β con una ingesta continua de cafeína también podría contribuir a la rápida tolerancia al efecto de la sustancia en la presión arterial (Shi et al., 1993).

Todos estos mecanismos discutidos para los beneficios mostrados de la cafeína para mejorar el rendimiento, o bien para incrementar la oxidación de grasas podrían sugerir un refuerzo a la literatura científica en diferentes campos que todavía no se habían investigado.

La ingesta de cafeína y la intensidad de ejercicio incrementa la oxidación de grasas

Como hemos referenciado en el marco teórico, la importancia de la intensidad de ejercicio es determinante para la selección de los sustratos energéticos. Por otro lado, también cabe señalar que la duración del ejercicio, las condiciones ambientales, el estado de entrenamiento y la dieta previa al entrenamiento también pueden influir en los niveles de oxidación de las grasas durante el ejercicio (Purdom et al., 2018). Específicamente, la tasa de oxidación de la grasa aumenta con la intensidad del ejercicio hasta una intensidad de ejercicio moderada que disminuye abruptamente con nuevos aumentos de la intensidad del ejercicio a cargas altas. Así pues, gráficamente, se produce una curva en forma de U invertida que asocia la intensidad del ejercicio y la tasa de oxidación de grasas (Maunder et al., 2018). Investigaciones anteriores han determinado que la tasa máxima de oxidación de la grasa se obtiene alrededor del 40 al 75% del VO_{2max} , atendiendo al nivel de entrenamiento de los sujetos (Maunder et al., 2018; Randell et al., 2017). En las investigaciones en las que la cafeína no modificó la oxidación del sustrato durante el ejercicio, la intensidad del ejercicio fue $> 70\% VO_{2max}$ (T. E. Graham & Spriet, 1995; Terry E. Graham et al., 2000b, 2008) o se eligió libremente (R. E. Beaumont & James, 2017; Hodgson et al., 2013). Por el contrario, las investigaciones en las que la cafeína aumentó la oxidación de las grasas durante el ejercicio utilizaron intensidades de ejercicio entre 50 y 65% VO_{2max} (Anderson & Hickey, 1994; Donnelly & McNaughton, 1992; Ryu et al., 2001; Schubert et al., 2014), o equivalentes al *Fatmax* (Alkhatib et al., 2015), o al estado estable de lactato máximo de los participantes (Cruz et al., 2015). En el estudio 3, los participantes pedalearon en un cicloergómetro a una intensidad que representaba el *Fatmax* ($52.1 \pm 9.8\%$ del VO_{2max} de los participantes). Podemos concluir que la cafeína puede aumentar la oxidación de grasas durante el ejercicio de resistencia submáxima con intensidades cercanas o inferiores a *Fatmax*. Por el contrario, en intensidades superiores a *Fatmax*, la cafeína puede ser ineficaz para modificar la oxidación del sustrato. Esta consecuencia está respaldada por una investigación reciente que probó el efecto de la ingesta aguda de cafeína en la oxidación de las grasas durante una prueba de ejercicio en test incremental (Gutiérrez-Hellín & Del Coso, 2018). En esa investigación, la cafeína aumentó la oxidación de grasas durante el ejercicio entre el 30 y 70% de VO_{2max} en participantes sanos y activos, pero no afectó a la oxidación de los sustratos cuando la intensidad del ejercicio fue $\geq 80\% VO_{2max}$. Estos resultados sugieren que la cafeína puede aumentar la dependencia de la grasa como

combustible en *Fatmax*. A mayores intensidades de ejercicio, la cafeína ejercerá un efecto ergogénico (R. E. Beaumont & James, 2017; Costill et al., 1978; Terry E. Graham et al., 2000b) que es independiente de los cambios en la oxidación del sustrato.

Además, en los resultados del estudio 3 sugieren que el efecto de la ingesta aguda de cafeína genera una reducción de los índices de esfuerzo percibido durante el ejercicio (figura 11), en particular al final de este. Debido al bloqueo de los receptores de adenosina, la cafeína aumenta indirectamente la liberación de norepinefrina, dopamina, acetilcolina y serotonina (Daly & Shi, 1999). La liberación de estos neurotransmisores establece un escenario facilitador para amortiguar el dolor durante el ejercicio, disminuyendo el esfuerzo percibido (Killen et al., 2013). Un meta-análisis que asocia el efecto de la cafeína en la fatiga y la ergogenicidad auto-reportada encontró que el efecto de la cafeína en la reducción de la calificación del esfuerzo percibido durante el ejercicio representaba el 29% de la varianza en la mejora del rendimiento del ejercicio (M. Doherty & Smith, 2005). En el estudio 3, no se investigó el rendimiento del ejercicio, ya que la intensidad y la duración del ejercicio se mantuvieron constantes en ambos ensayos experimentales. Sin embargo, la menor percepción del esfuerzo cuando los participantes ingirieron cafeína podría haber ayudado también a incrementar la oxidación de grasas, ya que la carga la percibían mas ligera que cuando ingirieron placebo. Podemos concluir que la ingestión de cafeína antes de un ensayo de ejercicio submáximo induce la liberación de neurotransmisores y catecolaminas que pueden 1) producir una mayor biodisponibilidad de los ácidos grasos y 2) un menor esfuerzo, lo que en última instancia puede dar lugar a una mayor dependencia de la grasa como fuente de energía para los músculos en contracción.

Adversidades de la ingesta de cafeína aguda y crónica en el deporte

En el estudio 3, tras una ingesta aguda de 3 mg/kg de peso de cafeína, se acompañó de varios efectos adversos antes y después del ejercicio (tabla 3). Antes del ejercicio, la cafeína aumentó la presión sistólica y diastólica, aunque el cambio en la presión arterial inducido por la cafeína tuvo poco impacto negativo en la muestra del estudio, ya que eran personas sanas y activas. Cabe destacar que, el efecto de la cafeína en el aumento de la presión arterial está bien respaldado, aunque la magnitud de este efecto depende de la dosis de cafeína (figura 21 y 22 (Wikoff et al., 2017)). Por otro lado, la falta de un efecto inducido por la cafeína en la frecuencia cardíaca en reposo también es un hallazgo común (tabla 9), y se ha relacionado con la compensación por la elevación de la presión arterial (Wikoff et al., 2017). 24 horas después del ejercicio, la cafeína aumentó los índices de percepción de nerviosismo y vigor. También se registraron inconvenientes como trastornos gastrointestinales, diuresis e insomnio (tabla 4). Estos efectos secundarios también han sido reportados en otras investigaciones realizados en atletas que buscaban mejorar su rendimiento con la misma dosis que hemos administrado en nuestro estudio (Lara et al., 2014, 2015; Salinero et al., 2014).

Aunque la ingesta de manera aguda presente esos efectos adversos, también pueden ser mantenidos durante días mediante una ingesta diaria. En el estudio 6, la ingesta de cafeína aumentó la presión arterial sistólica en $+9.1\pm 8.0\%$ (figura 21) en el primer día de ingestión. Sin embargo, no tuvo efecto en la frecuencia cardíaca en reposo (Tabla 9). Este efecto de la cafeína en el aumento de la presión arterial sistólica se mantuvo relativamente constante durante los primeros 8 días de ingestión consecutiva y luego se redujo progresivamente hasta que fue inexistente el día 20 (figura 21). Se observó un patrón similar en la presión arterial diastólica (figura 22), con un aumento de $7.6\pm 10.0\%$ en el primer día de ingestión de cafeína y un efecto progresivamente menor después. Estos datos coinciden con el efecto de tolerancia a la cafeína en la presión arterial descrito por Robertson et al., (1981), pero indican que la tolerancia no se completa hasta después de 20 días de ingestión consecutiva de cafeína y no en los 4 días de ingestión consecutiva de cafeína propuestos por Robertson et al., (1981). Esto es evidente por las particularidades del día 11 de ingestión: en este día, la presión arterial se midió antes (en lugar de después) de la ingestión de la cápsula asignada tanto para los tratamientos con cafeína como con placebo. Esta variación en el protocolo diario de ingesta de cafeína se eligió para evaluar la tolerancia a la cafeína

en el punto medio de los tratamientos, pero no interrumpió la ingesta diaria de las sustancias. En el día 11, tanto la presión arterial sistólica como la diastólica disminuyeron a un valor similar a las del ensayo con placebo (figuras 21 y 22). Curiosamente, estas variables cardiovasculares volvieron a aumentar el día 13 con la administración de cafeína, confirmando que la cafeína seguía siendo capaz de aumentar la presión arterial después de 13 días de ingesta constante y que no se había producido ninguna tolerancia en ese momento. Por lo tanto, podrían ser necesarios 20 días de ingesta constante de cafeína para observar una tolerancia completa al efecto de la sustancia en el aumento de la presión arterial. Desde una perspectiva clínica, la presión arterial elevada crónica es necesaria para considerar este factor como un riesgo de enfermedad cardiovascular (Mozaffarian et al., 2016). Por lo tanto, es probable que la tolerancia al efecto de la cafeína en la presión arterial elimine la mayor parte, si no todo, el impacto negativo de la cafeína en este tipo de afección (Grosso et al., 2017).

La percepción de los efectos adversos contestados 24 horas después de la ingesta de cafeína siguió un curso temporal de tolerancia diferente del mencionado anteriormente comparado con los efectos en la presión arterial. Por una parte, los niveles contestados por los sujetos de dolor de cabeza y dolor muscular no cambiaron con la ingesta aguda de cafeína y, por lo tanto, no se observó ninguna tolerancia (tabla 10). Es probable que las calificaciones respecto a los dolores gastrointestinales aumentarían durante los primeros 8 días de ingestión y luego disminuirían hasta quedar poco claras al final del tratamiento (tabla 10). Por otra parte, el nerviosismo, el vigor (figura 23 y 24 respectivamente), la irritabilidad, el insomnio y la diuresis (tabla 11) aumentaron con la cafeína en comparación con el placebo en diferentes días del tratamiento y se mantuvo o aumentó el patrón durante todo el tratamiento con cafeína. En general, estos datos indican que varios de los efectos adversos experimentados con la ingesta de cafeína persisten después de 20 días de ingestión constante. Si bien la falta de tolerancia completa al efecto de la cafeína en el vigor puede percibirse como positiva porque sugiere un aumento de la resistencia, y la persistencia de los efectos secundarios restantes indica que la ingestión crónica de una dosis moderada de cafeína podría producir inconvenientes.

Respuesta individual a la cafeína en el rendimiento deportivo

Debido a que la tolerancia al efecto ergogénico de la cafeína no se completó después de 20 días de ingestión consecutiva como se indicó en el estudio 4 y 5. En la presente Tesis Doctoral, realizamos un subanálisis con el fin de presentar las respuestas individuales a la ingestión aguda de cafeína en cada una de las 8 comparaciones idénticas de cafeína y placebo. En la figura 25 se muestra la variabilidad interindividual de respuesta a la ingestión de cafeína con una ergogenicidad diversa inducida por la cafeína entre los individuos. Además, la figura también muestra la variabilidad intra-individual de los efectos ergogénicos de la cafeína en ambas pruebas de rendimiento de los ejercicios. Esta figura cuestiona la noción de no respuesta al efecto ergogénico de la cafeína porque todos los participantes aumentaron la potencia media tanto de W_{max} como de Wingate de 3 a 8 veces de las 8 comparaciones de cafeína con placebo. Estos datos amplían la sugerencia de una ocurrencia mínima de falta de respuesta (Grgic, 2018a) porque muestra que todos los individuos respondieron a la cafeína mientras usaban pruebas repetidas de cafeína-placebo. Por lo tanto, esta Tesis Doctoral sugiere que sería necesario revisarse, y consecuentemente replantearse el concepto, de los no respondedores a los efectos ergogénicos de la cafeína.

Por otro lado, la figura 26 ofrece más información sobre este tema porque presenta datos individuales sobre los cambios inducidos por la cafeína en la presión arterial sistólica y diastólica en reposo medidos antes del ejercicio, variable que también se emplea para categorizar las respuestas individuales a la ingestión aguda de cafeína (Apostolidis et al., 2019). Como ocurre con el efecto ergogénico de la cafeína, los resultados en la presión arterial tuvieron una gran variabilidad inter e intra-individual. Sin embargo, los participantes con mayor respuesta a los efectos cardiovasculares de la cafeína fueron los que menos respondieron a los efectos ergogénicos de esta (con la excepción del sujeto 5). Para estudiar más a fondo esta relación, en la figura 27 se asocian las respuestas ergogénicas y cardiovasculares a la ingestión de cafeína. Curiosamente, los cambios inducidos por la ingesta de cafeína en la presión arterial sistólica y diastólica se relacionaron negativamente con la ergogenicidad en el rendimiento de los ciclos W_{max} y Wingate. Por lo tanto, las personas con una alta respuesta a los efectos cardiovasculares de la cafeína serían menos propensas a obtener beneficios ergogénicos de esta sustancia. Esta información sugiere que los efectos cardiovasculares y de rendimiento de la cafeína son algo incompatibles.



LIMITACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

LIMITACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral tiene diferentes limitaciones de estudio que debería ser discutidas:

- En primer lugar, utilizamos una prueba de ejercicio en test incremental para determinar el efecto de la cafeína en la saturación de oxígeno y en la tolerancia. Sin embargo, este protocolo de aumentar la intensidad del ejercicio no es representativo de ninguna competición de resistencia. Igual ocurre con un test de Wingate, que, aun siendo un sprint en bici, tiene poca aplicabilidad a deportes de resistencia, o bien, en deportes donde se solicite una respuesta rápida en ciclismo.
- Las mediciones del NIRS fueron realizadas en el vasto lateral externo de cada pierna, las cuales representan una pequeña porción de los músculos que participan en el pedaleo. Para asegurar el efecto de la cafeína en la oxigenación de los tejidos durante el ciclismo, la medición del contenido de oxígeno del músculo debe hacerse en otros músculos de la pierna. Aunque el espectrómetro utilizado en esta investigación es una herramienta válida y fiable para evaluar la saturación local de oxígeno, se ha comprobado que su fiabilidad se reduce junto con la intensidad del ejercicio (Crum et al., 2017).
- Han sido utilizadas en todos los estudios sólo una dosis de cafeína (3 mg/kg) y, por lo tanto, no se puede determinar si existe un efecto dosis-respuesta de la cafeína en la saturación de oxígeno de los músculos.
- No se obtuvo muestras de sangre, ni biopsias, ni orinas, por lo tanto, es difícil saber la respuesta individual de la cafeína. Además, no se pudo separar el efecto inducido por la ingesta de cafeína en el tejido adiposo / oxidación de triglicéridos intramusculares. Tampoco podemos establecer la capacidad de la cafeína para llevar los ácidos grasos liberados al músculo esquelético activo.

- La duración de la ingesta crónica de cafeína duró 20 días y es imposible determinar si se produciría una mayor tolerancia a los efectos ergogénicos de la cafeína después de 20 días de ingestión. Además, las personas consideradas como consumidoras habituales de cafeína pueden utilizar esta sustancia diariamente durante años y, por lo tanto, esta investigación podría no ser representativa de este consumo crónico (Gonçalves et al., 2017).
- Por último, se reclutaron 11 participantes para los estudios 4, 5, 6 y 7, por lo que se requiere la confirmación de estos resultados con una muestra más amplia para producir una comprensión más generalizada y completa de la tolerancia a los efectos de la cafeína.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La ergogenicidad de la cafeína que se observa en el ejercicio de máxima intensidad es, al menos en parte, impulsada por los cambios en el $VO_{2\text{pico}}$, ventilación pulmonar y acumulación de lactato en sangre. Además, se encontró una mayor saturación de oxígeno muscular inducida por la cafeína en cargas de trabajo de bajas a moderadas, lo que permitió obtener el punto final de la saturación de oxígeno muscular asociada a la fatiga a una mayor intensidad de ejercicio. Sin embargo, durante un test de Wingate de 15-s, la descarga de oxígeno cuando ingieres cafeína no es un mecanismo que mejore el rendimiento en pruebas anaeróbicas de corta duración.
- La ingestión aguda de cafeína aumentó la oxidación de las grasas durante 1 hora de ciclo en *Fatmax* a expensas de la reducción de la oxidación de los carbohidratos. El efecto de la cafeína sobre la oxidación de las grasas estuvo presente durante todo el ensayo y produjo un incremento significativo del 27.0% en la cantidad de grasa oxidada durante el ensayo.
- Existe una tolerancia progresiva a los beneficios del rendimiento de la cafeína, en particular porque la magnitud del efecto ergogénico de la cafeína fue mayor el primer día de ingestión tanto para el ejercicio aeróbico como para el anaeróbico y la transición de aeróbico a anaeróbico, y disminuyó después.
- El efecto de la cafeína en la elevación de la presión sanguínea se eliminó después de 20 días de ingestión constante. En cambio, los efectos adversos típicamente asociados con la ingestión de cafeína, como el aumento del nerviosismo, el aumento del vigor, la irritabilidad, el insomnio y la diuresis, permanecieron después de 20 días de ingestión.
- Los resultados en esta tesis sugieren que las personas con una alta respuesta a los efectos cardiovasculares de la cafeína serían menos propensas a obtener beneficios ergogénicos de este estimulante.





**APLICACIONES
PRÁCTICAS DE LA
TESIS DOCTORAL**

APLICACIONES PRÁCTICAS DE LA TESIS DOCTORAL

- La cafeína debería recomendarse a personas sanas que tienen por objetivo aumentar la oxidación de las grasas durante el ejercicio o mejorar el rendimiento deportivo. Es importante remarcar que aquellas personas con antecedentes de problemas cardiovasculares o de alta sensibilidad a la cafeína pueden verse afectadas por los efectos adversos presentados. Además, debido a la tolerancia sugerida en los resultados de los estudios su ingesta sólo debe recomendarse para las sesiones de ejercicio específicas o relevantes.
- Se recomienda una planificación previa en entrenamiento y en competición de la administración de cafeína y su dosis para conseguir un rendimiento y efectos óptimos, atendiendo a la respuesta individual de cada deportista y su estado en ese momento. Esta opción podría otorgar el mayor beneficio para el deportista desde una perspectiva de rendimiento deportivo.
- Una dosis de 3 mg de cafeína por kg de masa corporal puede emplearse agudamente para aumentar la intensidad del ejercicio en el segundo umbral de ventilación, lo que puede representar un beneficio potencial para el entrenamiento y la competición en pruebas de larga duración.
- El ajuste de la dosis, el momento y la forma de administración de la cafeína apropiada para un deportista podría requerir varios exámenes en los que se debería medir y registrar el rendimiento físico y los efectos secundarios de la cafeína en una situación de control. Reunir conclusiones sobre el efecto ergogénico de la cafeína en un individuo únicamente sobre la base de los resultados de una prueba de rendimiento podría inducir a error tanto en el ámbito científico como en el deportivo.





FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Dados los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, podrían surgir nuevas líneas de investigación interesantes, o actuales que deben ser reforzadas.

- Se ha demostrado que la saturación de oxígeno tiene una alta relación con la oxidación de sustratos energéticos, concretamente, que la oxidación de grasas a mayor % de oxihemoglobina saturada, mayor es la cinética de las mismas (Zurbuchen et al., 2020). Por lo tanto, podría estar asociado la saturación de oxígeno con una mayor oxidación de grasas inducido por los efectos de la cafeína.
- La oxidación de grasas y la relación con la cafeína, como hemos nombrado anteriormente, se ha relacionado siempre con factores de rendimiento, pero nunca se ha realizado objetivando el efecto de varias dosis de la cafeína durante un rango de intensidades.
- Dado que esta tesis presenta 1 estudio basados en la intensidad y en la duración de 1 hora de ciclismo, y, adicionalmente, ya lo han demostrado en la revisión de Shen et al., (2019) en su revisión, los autores declararon que tras una ingesta aguda de cafeína, el efecto ergogénico aumenta con la duración de la actividad de ejercicio. Quizás, sería interesante analizar ese efecto asociado a la cinética sustratos energéticos durante una prueba mas larga, comparado con 2 o 3 horas de pedaleo, y analizar si el efecto ergogénico de la sustancia mejora tras varias horas de ejercicio.
- Otro efecto para estudiar dentro de la tolerancia a la cafeína sería a través de periodos más largos, ya que los hallazgos de nuestra investigación se centran en 20 días de ingesta continuada. Sin embargo, R. Beaumont et al., (2017) lo realizaron durante 28 días y reportaron que la cafeína dejó de ser ergogénica después de esos días. Por otro lado, todas las investigaciones se han centrado solo en pruebas equivalentes a la resistencia, sin embargo, ninguna se propuso como objetivo la tolerancia en ejercicios de fuerza. Por lo tanto, sería interesante analizar la ingesta crónica en un rango de intensidades en fuerza, concretamente en el miembro superior, ya que se ha demostrado en una revisión sistemática y meta-analítica, que la cafeína tiene mayor efecto ergogénico en esa porción del cuerpo (Grgic et al., 2018). Por lo tanto, debería ser necesario para un mayor entendimiento de la tolerancia en lo que en rendimiento deportivo.





TOLERANCE

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Navarro, M., Muñoz, G., Salinero, J. J., Muñoz-Guerra, J., Fernández-álvarez, M., Plata, M. D. M., & Del Coso, J. (2019). Urine caffeine concentration in doping control samples from 2004 to 2015. *Nutrients*.
<https://doi.org/10.3390/nu11020286>
- Alkhatib, A., Seijo, M., Larumbe, E., & Naclerio, F. (2015). Acute effectiveness of a “fat-loss” product on substrate utilization, perception of hunger, mood state and rate of perceived exertion at rest and during exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*.
<https://doi.org/10.1186/s12970-015-0105-8>
- Amaro-Gahete, F. J., Sanchez-Delgado, G., Jurado-Fasoli, L., De-la-O, A., Castillo, M. J., Helge, J. W., & Ruiz, J. R. (2019). Assessment of maximal fat oxidation during exercise: A systematic review. *In Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* (Vol. 29, Issue 7, pp. 910–921). Blackwell Munksgaard.
<https://doi.org/10.1111/sms.13424>
- Anderson, D. E., & Hickey, M. S. (1994). Effects of caffeine on the metabolic and catecholamine responses to exercise in 5 and 28°C. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/00005768-199404000-00009>
- Apostolidis, A., Mougios, V., Smilios, I., Rodosthenous, J., & Hadjicharalambous, M. (2019). Caffeine supplementation: Ergogenic in both high and low caffeine responders. *International Journal of Sports Physiology and Performance*.
<https://doi.org/10.1123/ijsp.2018-0238>
- Attwood, A. S., Higgs, S., & Terry, P. (2007). Differential responsiveness to caffeine and perceived effects of caffeine in moderate and high regular caffeine consumers. *Psychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1007/s00213-006-0643-5>

- Ballard, H. J. (2014). ATP and adenosine in the regulation of skeletal muscle blood flow during exercise. *In Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*.
<https://doi.org/10.13294/j.aps.2014.0009>
- Baltazar-Martins, J. G., Brito De Souza, D., Aguilar-Navarro, M., Grgic, J., & Del Coso, J. (2019). Infographic. the road to the ergogenic effect of caffeine on exercise performance. *In British Journal of Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2019-101018>
- Bar-Or, O. (1987). The Wingate Anaerobic Test. *Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.2165/00007256-198704060-00001>
- Beaumont, R., Cordery, P., Funnell, M., Mears, S., James, L., & Watson, P. (2017). Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. *Journal of Sports Sciences*.
<https://doi.org/10.1080/02640414.2016.1241421>
- Beaumont, R. E., & James, L. J. (2017). Effect of a moderate caffeine dose on endurance cycle performance and thermoregulation during prolonged exercise in the heat. *Journal of Science and Medicine in Sport*.
<https://doi.org/10.1016/j.jsams.2017.03.017>
- Bell, D. G., & McLellan, T. M. (2002). Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *Journal of Applied Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00187.2002>
- Berry, M. J., Stoneman, J. V., Weyrich, A. S., & Burney, B. (1991). Dissociation of the ventilatory and lactate thresholds following caffeine ingestion. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/00005768-199104000-00012>
- Biaggioni, I., Olafsson, B., Robertson, R. M., Hollister, A. S., & Robertson, D. (1987). Cardiovascular and respiratory effects of adenosine in conscious man. Evidence for chemoreceptor activation. *Circulation Research*.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.61.6.779>

- Borg, G. A. V. (1982). Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/00005768-198205000-00012>
- Brouwer, E. (1957). On simple formulae for calculating the heat expenditure and the quantities of carbohydrate and fat oxidized in metabolism of men and animals, from gaseous exchange (Oxygen intake and carbonic acid output) and urine-N. *Acta Physiologica et Pharmacologica Neerlandica*.
- Burke, L. M. (2008). Caffeine and sports performance. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*.
<https://doi.org/10.1139/H08-130>
- Burke, L. M., Hawley, J. A., Wong, S. H. S., & Jeukendrup, A. E. (2011). Carbohydrates for training and competition. *Journal of Sports Sciences*.
<https://doi.org/10.1080/02640414.2011.585473>
- Childs, E., & De Wit, H. (2006). Subjective, behavioral, and physiological effects of acute caffeine in light, nondependent caffeine users. *Psychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1007/s00213-006-0341-3>
- Chou, D. T., Khan, S., Forde, J., & Hirsh, K. R. (1985). Caffeine tolerance: Behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. *Life Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90325-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90325-X)
- Collado-Mateo, D., Lavín-Pérez, A. M., Merellano-Navarro, E., & Del Coso, J. (2020). Effect of acute caffeine intake on the fat oxidation rate during exercise: A systematic review and meta-analysis. *In Nutrients*.
<https://doi.org/10.3390/nu12123603>
- Conlay, L. A., Conant, J. A., Debros, F., & Wurtman, R. (1997). Caffeine alters plasma adenosine levels. *In Nature*.
<https://doi.org/10.1038/38160>

- Corti, R., Binggeli, C., Sudano, I., Spieker, L., Hänseler, E., Ruschitzka, F., Chaplin, W. F., Lüscher, T. F., & Noll, G. (2002). Coffee acutely increases sympathetic nerve activity and blood pressure independently of caffeine content role of habitual versus nonhabitual drinking. *Circulation*.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000046228.97025.3A>
- Coso, J. Del, Hamouti, N., Aguado-Jimenez, R., & Mora-Rodriguez, R. (2009). Respiratory compensation and blood pH regulation during variable intensity exercise in trained versus untrained subjects. *European Journal of Applied Physiology*.
<https://doi.org/10.1007/s00421-009-1101-y>
- Costill, D. L., Dalsky, G. P., & Fink, W. J. (1978). Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance. *Medicine and Science in Sports*.
- Crum, E. M., O'Connor, W. J., Van Loo, L., Valckx, M., & Stannard, S. R. (2017). Validity and reliability of the Moxy oxygen monitor during incremental cycling exercise. *European Journal of Sport Science*.
<https://doi.org/10.1080/17461391.2017.1330899>
- Cruz, R. S. de O., de Aguiar, R. A., Turnes, T., Guglielmo, L. G. A., Beneke, R., & Caputo, F. (2015). Caffeine affects time to exhaustion and substrate oxidation during cycling at maximal lactate steady state. *Nutrients*.
<https://doi.org/10.3390/nu7075219>
- D'Urzo, A. D., Jhirad, R., Jenne, H., Avendano, M. A., Rubenstein, I., D'Costa, M., & Goldstein, R. S. (1990). Effect of caffeine on ventilatory responses to hypercapnia, hypoxia, and exercise in humans. *Journal of Applied Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1990.68.1.322>
- Daly, J., & Shi, D. (1999). The role of adenosine receptors in the central action of caffeine. *In Caffeine and Behavior*.
<https://doi.org/10.1201/9781439822470.ch1>
- Davis, J. K., & Green, J. M. (2009). Caffeine and anaerobic performance: Ergogenic value and mechanisms of action. *In Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.2165/11317770-000000000-00000>

- Davis, J. M., Zhao, Z., Stock, H. S., Mehl, K. A., Buggy, J., & Hand, G. A. (2003). Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00386.2002>
- Del Coso, J., Muñoz, G., & Muñoz-Guerra, J. (2011). Prevalence of caffeine use in elite athletes following its removal from the world anti-doping agency list of banned substances. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*.
<https://doi.org/10.1139/h11-052>
- Del Coso, J., Salinero, J. J., & Lara, B. (2020). Effects of Caffeine and Coffee on Human Functioning. *Nutrients*, 12(1), 125.
<https://doi.org/10.3390/nu12010125>
- Delbeke, F. T., & Debackere, M. (1984). Caffeine: Use and abuse in sports. *International Journal of Sports Medicine*, 5(4), 179–182.
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1025901>
- Denadai, B. S., & Denadai, M. L. D. R. (1998). Effects of caffeine on time to exhaustion in exercise performed below and above the anaerobic threshold. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000400017>
- Dodd, S. L., Brooks, E., Powers, S. K., & Tulley, R. (1991). The effects of caffeine on graded exercise performance in caffeine naive versus habituated subjects. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*.
<https://doi.org/10.1007/BF00626615>
- Doherty, M., & Smith, P. M. (2005). Effects of caffeine ingestion on rating of perceived exertion during and after exercise: A meta-analysis. *In Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2005.00445.x>
- Doherty, Mike, & Smith, P. M. (2004). Effects of caffeine ingestion on exercise testing: A meta-analysis. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*.
<https://doi.org/10.1123/ijsnem.14.6.626>

- Donnelly, K., & McNaughton, L. (1992). The effects of two levels of caffeine ingestion on excess postexercise oxygen consumption in untrained women. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*.
<https://doi.org/10.1007/BF00243514>
- Echeverri, D., Montes, F. R., Cabrera, M., Galán, A., & Prieto, A. (2010). Caffeine's vascular mechanisms of action. *In International Journal of Vascular Medicine*.
<https://doi.org/10.1155/2010/834060>
- Edvardsen, E., Hem, E., & Anderssen, S. A. (2014). End criteria for reaching maximal oxygen uptake must be strict and adjusted to sex and age: A cross-sectional study. *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085276>
- Evans, M., Tierney, P., Gray, N., Hawe, G., Macken, M., & Egan, B. (2018). Acute ingestion of caffeinated chewing gum improves repeated sprint performance of team sport athletes with low habitual caffeine consumption. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*.
<https://doi.org/10.1123/ijsnem.2017-0217>
- Filip, A., Wilk, M., Krzysztofik, M., & Del Coso, J. (2020). Inconsistency in the ergogenic effect of caffeine in athletes who regularly consume caffeine: Is it due to the disparity in the criteria that defines habitual caffeine intake? *Nutrients*.
<https://doi.org/10.3390/nu12041087>
- Frandsen, J., Pistoljevic, N., Quesada, J. P., Amaro-Gahete, F. J., Ritz, C., Larsen, S., Dela, F., & Helge, J. W. (2020). Menstrual cycle phase does not affect whole body peak fat oxidation rate during a graded exercise test. *Journal of Applied Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00774.2019>
- Fredholm, B. B. (1979). Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends in Pharmacological Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/0165-6147\(79\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0165-6147(79)90046-4)
- Fredholm, B. B. (1982). Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine. *Acta Physiologica Scandinavica*.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1982.tb07078.x>

- Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zwartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *In Pharmacological Reviews*.
- Fredholm, B. B., Yang, J., & Wang, Y. (2017). Low, but not high, dose caffeine is a readily available probe for adenosine actions. *In Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.011>
- Fulton, J. L., Dinas, P. C., Carrillo, A. E., Edsall, J. R., Ryan, E. J., & Ryan, E. J. (2018). Impact of genetic variability on physiological responses to caffeine in humans: A systematic review. *In Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10101373>
- Ganio, M. S., Klau, J. F., Casa, D. J., Armstrong, L. E., & Maresh, C. M. (2009). Effect of caffeine on sport-specific endurance performance: A systematic review. *In Journal of Strength and Conditioning Research*. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e31818b979a>
- Gaskell, S. E., Ruby, B. C., Walker, A. J., Sanchez, O. A., Serfass, R. C., & Leon, A. S. (2001). Validity and reliability of combining three methods to determine ventilatory threshold. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. <https://doi.org/10.1097/00005768-200111000-00007>
- Glaister, M., & Gissane, C. (2018). Caffeine and physiological responses to submaximal exercise: A meta-analysis. *In International Journal of Sports Physiology and Performance*. <https://doi.org/10.1123/ijsp.2017-0312>
- Gonçalves, L. de S., Painelli, V. de S., Yamaguchi, G., Oliveira, L. F. de, Saunders, B., da Silva, R. P., Maciel, E., Artioli, G. G., Roschel, H., & Gualano, B. (2017). Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00260.2017>
- Graham, T. E. (2001). Caffeine and exercise metabolism, endurance and performance. *In Sports Medicine*. <https://doi.org/10.2165/00007256-200131110-00002>

- Graham, T. E., & Spriet, L. L. (1995). Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *Journal of Applied Physiology*. <https://doi.org/10.1152/japopl.1995.78.3.867>
- Graham, Terry E., Battram, D. S., Dela, F., El-Sohemy, A., & Thong, F. S. L. (2008). Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise? *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. <https://doi.org/10.1139/H08-129>
- Graham, Terry E., Helge, J. W., MacLean, D. A., Kiens, B., & Richter, E. A. (2000a). Caffeine ingestion does not alter carbohydrate or fat metabolism in human skeletal muscle during exercise. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00837.x>
- Graham, Terry E., Helge, J. W., MacLean, D. A., Kiens, B., & Richter, E. A. (2000b). Caffeine ingestion does not alter carbohydrate or fat metabolism in human skeletal muscle during exercise. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00837.x>
- Greer, F., McLean, C., & Graham, T. E. (1998). Caffeine, performance, and metabolism during repeated Wingate exercise tests. *Journal of Applied Physiology*. <https://doi.org/10.1152/japopl.1998.85.4.1502>
- Grgic, J. (2018a). Are There Non-Responders to the Ergogenic Effects of Caffeine Ingestion on Exercise Performance? *In Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10111736>
- Grgic, J. (2018b). Caffeine ingestion enhances Wingate performance: a meta-analysis. *In European Journal of Sport Science*. <https://doi.org/10.1080/17461391.2017.1394371>
- Grgic, J., Grgic, I., Pickering, C., Schoenfeld, B. J., Bishop, D. J., & Pedisic, Z. (2019). Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance—an umbrella review of 21 published meta-analyses. *British Journal of Sports Medicine, bjsports-2018-100278*. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-100278>

- Grgic, J., & Mikulic, P. (2017). Caffeine ingestion acutely enhances muscular strength and power but not muscular endurance in resistance-trained men. *European Journal of Sport Science*.
<https://doi.org/10.1080/17461391.2017.1330362>
- Grgic, J., & Mikulic, P. (2020). Acute effects of caffeine supplementation on resistance exercise, jumping, and Wingate performance: no influence of habitual caffeine intake. *European Journal of Sport Science*.
<https://doi.org/10.1080/17461391.2020.1817155>
- Grgic, J., Trexler, E. T., Lazinica, B., & Pedisic, Z. (2018). Effects of caffeine intake on muscle strength and power: A systematic review and meta-analysis. *In Journal of the International Society of Sports Nutrition*.
<https://doi.org/10.1186/s12970-018-0216-0>
- Grosso, G., Godos, J., Galvano, F., & Giovannucci, E. L. (2017). Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. *In Annual Review of Nutrition*.
<https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064941>
- Guessous, I., Eap, C. B., & Bochud, M. (2014). Blood Pressure in Relation to Coffee and Caffeine Consumption. *In Current Hypertension Reports*.
<https://doi.org/10.1007/s11906-014-0468-2>
- Gutiérrez-Hellín, J., & Del Coso, J. (2018). Effects of p-Syneprine and Caffeine Ingestion on Substrate Oxidation during Exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001653>
- Gutiérrez-Hellín, J., Ruiz-Moreno, C., & Del Coso, J. (2020). Acute p-syneprine ingestion increases whole-body fat oxidation during 1-h of cycling at *Fatmax*. *European Journal of Nutrition*.
<https://doi.org/10.1007/s00394-019-02101-6>
- Hachana, Y., Attia, A., Nassib, S., Shephard, R. J., & Chelly, M. S. (2012). Test-retest reliability, criterion-related validity, and minimal detectable change of score on an abbreviated wingate test for field sport participants. *Journal of Strength and Conditioning Research*.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3182305485>

- Haskell, C. F., Kennedy, D. O., Wesnes, K. A., & Scholey, A. B. (2005). Cognitive and mood improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1007/s00213-004-2104-3>
- Hodgson, A. B., Randell, R. K., & Jeukendrup, A. E. (2013). The Metabolic and Performance Effects of Caffeine Compared to Coffee during Endurance Exercise. *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059561>
- Hopkins, W. G., Marshall, S. W., Batterham, A. M., & Hanin, J. (2009). Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *In Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31818cb278>
- Horton, T. J., Miller, E. K., Glueck, D., & Tench, K. (2002). No effect of menstrual cycle phase on glucose kinetics and fuel oxidation during moderate-intensity exercise. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00238.2001>
- Irwin, C., Desbrow, B., Ellis, A., O'Keeffe, B., Grant, G., & Leveritt, M. (2011). Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance. *Journal of Sports Sciences*.
<https://doi.org/10.1080/02640414.2010.541480>
- Jenkins, N. T., Trilk, J. L., Singhal, A., O'Connor, P. J., & Cureton, K. J. (2008). Ergogenic effects of low doses of caffeine on cycling performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*.
<https://doi.org/10.1123/ijsnem.18.3.328>
- Jeukendrup, A. E., & Randell, R. (2011). Fat burners: Nutrition supplements that increase fat metabolism. *Obesity Reviews*.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00908.x>
- Kalmar, J. M. (2005). The influence of caffeine on voluntary muscle activation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/01.mss.0000178219.18086.9e>

- Kamimori, G. H., Joubert, A., Otterstetter, R., Santaromana, M., & Eddington, N. D. (1999). The effect of the menstrual cycle on the pharmacokinetics of caffeine in normal, healthy eumenorrheic females. *European Journal of Clinical Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1007/s002280050654>
- Karapetian, G. K., Engels, H. J., Gretebeck, K. A., & Gretebeck, R. J. (2012). Effect of caffeine on LT, VT and HRVT. *International Journal of Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1055/s-0032-1301904>
- Kennedy, D. O., & Haskell, C. F. (2011). Cerebral blood flow and behavioural effects of caffeine in habitual and non-habitual consumers of caffeine: A near infrared spectroscopy study. *Biological Psychology*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.12.010>
- Killen, L. G., Green, J. M., O'Neal, E. K., McIntosh, J. R., Hornsby, J., & Coates, T. E. (2013). Effects of caffeine on session ratings of perceived exertion. *European Journal of Applied Physiology*.
<https://doi.org/10.1007/s00421-012-2480-z>
- Kim, J., Park, J., & Lim, K. (2016). Nutrition supplements to stimulate lipolysis: A review in relation to endurance exercise capacity. *In Journal of Nutritional Science and Vitaminology*.
<https://doi.org/10.3177/jns.v62.141>
- Kime, R., Niwayama, M., Kaneko, Y., Takagi, S., Fuse, S., Osada, T., Murase, N., & Katsumura, T. (2016). Muscle deoxygenation and its heterogeneity changes after endurance training. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 923, 275–281.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-38810-6_37
- Koupenova, M., & Ravid, K. (2013). Adenosine, Adenosine Receptors and Their Role in Glucose Homeostasis and Lipid Metabolism. *Journal of Cellular Physiology*.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24352>
- Lara, B., Gonzalez-Millán, C., Salinero, J. J., Abian-Vicen, J., Areces, F., Barbero-Alvarez, J. C., Muñoz, V., Portillo, L. J., Gonzalez-Rave, J. M., & Del Coso, J. (2014). Caffeine-containing energy drink improves physical performance in female soccer players. *Amino Acids*.
<https://doi.org/10.1007/s00726-014-1709-z>

- Lara, B., Gutiérrez-Hellín, J., García-Bataller, A., Rodríguez-Fernández, P., Romero-Moraleda, B., & Del Coso, J. (2020). Ergogenic effects of caffeine on peak aerobic cycling power during the menstrual cycle. *European Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02100-7>
- Lara, B., Gutiérrez-Hellín, J., Ruíz-Moreno, C., Romero-Moraleda, B., & Del Coso, J. (2020). Acute caffeine intake increases performance in the 15-s Wingate test during the menstrual cycle. *British Journal of Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bcp.14175>
- Lara, B., Ruiz-Vicente, D., Areces, F., Abián-Vicén, J., Salinero, J. J., Gonzalez-Millán, C., Gallo-Salazar, C., & Del Coso, J. (2015). Acute consumption of a caffeinated energy drink enhances aspects of performance in sprint swimmers. *British Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002573>
- Layland, J., Carrick, D., Lee, M., Oldroyd, K., & Berry, C. (2014). Adenosine: Physiology, pharmacology, and clinical applications. In *JACC: Cardiovascular Interventions*. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2014.02.009>
- Lucia, A., Hoyos, J., Perez, M., & Chicharro, J. L. (2000). Heart rate and performance parameters in elite cyclists: A longitudinal study. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. <https://doi.org/10.1097/00005768-200010000-00018>
- Magkos, F., & Kavouras, S. A. (2005). Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/1040-830491379245>
- Marfell-jones, M., Olds, T., Stewart, A., & Carter, L. (2006). International standards for anthropometric assessment. International Society for the Advancement of Kinanthropometry. *International Society for the Advancement of Kinanthropometry*.

- Maughan, R. J., Burke, L. M., Dvorak, J., Larson-Meyer, D. E., Peeling, P., Phillips, S. M., Rawson, E. S., Walsh, N. P., Garthe, I., Geyer, H., Meeusen, R., Van Loon, L. J. C., Shirreffs, S. M., Spriet, L. L., Stuart, M., Vernec, A., Currell, K., Ali, V. M., Budgett, R. G., ... Engebretsen, L. (2018). IOC consensus statement: Dietary supplements and the high-performance athlete. *In British Journal of Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099027>
- Maunder, E., Plews, D. J., & Kilding, A. E. (2018). Contextualising maximal fat oxidation during exercise: Determinants and normative values. *In Frontiers in Physiology*.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00599>
- McCall, A. L., Millington, W. R., & Wurtman, R. J. (1982). Blood-brain barrier transport of caffeine: Dose-related restriction of adenine transport. *Life Sciences*.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(82\)90715-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90715-9)
- McNaughton, L. A. R. S. (1987). Two levels of caffeine ingestion on blood lactate and free fatty acid responses during incremental exercise. *Research Quarterly for Exercise and Sport*. <https://doi.org/10.1080/02701367.1987.10605458>
- Meeusen, R., Roelands, B., & Spriet, L. L. (2013). Caffeine, exercise and the brain. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*.
<https://doi.org/10.1159/000350223>
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., Das, S. R., de Ferranti, S., Després, J.-P., Fullerton, H. J., Howard, V. J., Huffman, M. D., Isasi, C. R., Jiménez, M. C., Judd, S. E., Kissela, B. M., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Liu, S., ... Turner, M. B. (2016). Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation*.
<https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000350>
- Muñoz, A., López-Samanes, Á., Pérez-López, A., Aguilar-Navarro, M., Moreno-Heredero, B., Rivilla-García, J., González-Frutos, P., Pino-Ortega, J., Morencos, E., & Del Coso, J. (2020). Effects of Caffeine Ingestion on Physical Performance in Elite Women Handball Players: A Randomized, Controlled Study. *International Journal of Sports Physiology and Performance*.
<https://doi.org/10.1123/ijsp.2019-0847>

- Nehlig, A., Daval, J. L., & Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *In Brain Research Reviews*.
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(92\)90012-B](https://doi.org/10.1016/0165-0173(92)90012-B)
- Péronnet, F., & Aguilaniu, B. (2006). Lactic acid buffering, nonmetabolic CO₂ and exercise hyperventilation: A critical reappraisal. *In Respiratory Physiology and Neurobiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2005.04.005>
- Pickering, C., & Grgic, J. (2019). Caffeine and Exercise: What Next? *In Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1007/s40279-019-01101-0>
- Pickering, C., & Kiely, J. (2018). Are the Current Guidelines on Caffeine Use in Sport Optimal for Everyone? Inter-individual Variation in Caffeine Ergogenicity, and a Move Towards Personalised Sports Nutrition. *Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1007/s40279-017-0776-1>
- Purdom, T., Kravitz, L., Dokladny, K., & Mermier, C. (2018). Understanding the factors that effect maximal fat oxidation. *In Journal of the International Society of Sports Nutrition*.
<https://doi.org/10.1186/s12970-018-0207-1>
- Raasch, C. C., Zajac, F. E., Ma, B., & Levine, W. S. (1997). Muscle coordination of maximum-speed pedaling. *Journal of Biomechanics*.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(96\)00188-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(96)00188-1)
- Racinais, S., Buchheit, M., & Girard, O. (2014). Breakpoints in ventilation, cerebral and muscle oxygenation, and muscle activity during an incremental cycling exercise. *Frontiers in Physiology*.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00142>
- Randell, R. K., Rollo, I., Roberts, T. J., Dalrymple, K. J., Jeukendrup, A. E., & Carter, J. M. (2017). Maximal Fat Oxidation Rates in an Athletic Population. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001084>

- Rivers, W. H. R., & Webber, H. N. (1907). The action of caffeine on the capacity for muscular work. *The Journal of Physiology*.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1907.sp001215>
- Robertson, D., Wade, D., Workman, R., Woosley, R. L., & Oates, J. A. (1981). Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI110124>
- Ryu, S., Choi, S. K., Joung, S. S., Suh, H., Cha, Y. S., Lee, S., & Lim, K. (2001). Caffeine as a lipolytic food component increases endurance performance in rats and athletes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.47.139>
- Salinero, J. J., Lara, B., Abian-Vicen, J., Gonzalez-Millán, C., Areces, F., Gallo-Salazar, C., Ruiz-Vicente, D., & Del Coso, J. (2014). The use of energy drinks in sport: Perceived ergogenicity and side effects in male and female athletes. *British Journal of Nutrition*.
<https://doi.org/10.1017/S0007114514002189>
- Salinero, J. J., Lara, B., & Del Coso, J. (2019). Effects of acute ingestion of caffeine on team sports performance: a systematic review and meta-analysis. *In Research in Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1080/15438627.2018.1552146>
- Salinero, J. J., Lara, B., Jiménez-Ormeño, E., Romero-Moraleda, B., Giráldez-Costas, V., Baltazar-Martins, G., & Del Coso, J. (2019). More research is necessary to establish the ergogenic effect of caffeine in female athletes. *In Nutrients*.
<https://doi.org/10.3390/nu11071600>
- Salinero, J. J., Lara, B., Ruiz-Vicente, D., Areces, F., Puente-Torres, C., Gallo-Salazar, C., Pascual, T., & Del Coso, J. (2017). CYP1A2 genotype variations do not modify the benefits and drawbacks of caffeine during exercise: A pilot study. *Nutrients*.
<https://doi.org/10.3390/nu9030269>

- Sawka, M. N., Burke, L. M., Eichner, E. R., Maughan, R. J., Montain, S. J., & Stachenfeld, N. S. (2007). Exercise and fluid replacement. *In Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/mss.0b013e31802ca597>
- Schubert, M. M., Sabapathy, S., Leveritt, M., & Desbrow, B. (2014). Acute exercise and hormones related to appetite regulation: A meta-analysis. *In Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1007/s40279-013-0120-3>
- Shen, J. G., Brooks, M. B., Cincotta, J., & Manjourides, J. D. (2019). Establishing a relationship between the effect of caffeine and duration of endurance athletic time trial events: A systematic review and meta-analysis. *In Journal of Science and Medicine in Sport*.
<https://doi.org/10.1016/j.jsams.2018.07.022>
- Shi, D., Nikodijević, O., Jacobson, K. A., & Daly, J. W. (1993). Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*.
<https://doi.org/10.1007/BF00733753>
- Silveira, R., Andrade-Souza, V. A., Arcoverde, L., Tomazini, F., Sansonio, A., Bishop, D. J., Bertuzzi, R., & Lima-Silva, A. E. (2018). Caffeine Increases Work Done above Critical Power, but Not Anaerobic Work. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001408>
- Skinner, T. L., Desbrow, B. E. N., Arapova, J., Schaumberg, M. A., Osborne, J., Grant, G. D., Anoopkumar-Dukie, S., & Leveritt, M. D. (2019). Women Experience the Same Ergogenic Response to Caffeine as Men. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001885>
- Sökmen, B., Armstrong, L. E., Kraemer, W. J., Casa, D. J., Dias, J. C., Judelson, D. A., & Maresch, C. M. (2008). Caffeine use in sports: Considerations for the athlete. *In Journal of Strength and Conditioning Research*.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181660cec>

- Southward, K., Rutherford-Markwick, K., Badenhorst, C., & Ali, A. (2018). Response to “are there non-responders to the ergogenic 3 effects of caffeine ingestion on exercise performance?” *In Nutrients*.
<https://doi.org/10.3390/nu10111752>
- Southward, K., Rutherford-Markwick, K. J., & Ali, A. (2018). The Effect of Acute Caffeine Ingestion on Endurance Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. *In Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1007/s40279-018-0939-8>
- Spriet, L. L., MacLean, D. A., Dyck, D. J., Hultman, E., Cederblad, G., & Graham, T. E. (1992). Caffeine ingestion and muscle metabolism during prolonged exercise in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.262.6.e891>
- Spriet, Lawrence L. (2014). Exercise and Sport Performance with Low Doses of Caffeine. *In Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1007/s40279-014-0257-8>
- Stadheim, H. K., Spencer, M., Olsen, R., & Jensen, Jø. (2014). Caffeine and performance over consecutive days of simulated competition. *Medicine and Science in Sports and Exercise*.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000288>
- Svenningsson, P., Nomikos, G. G., & Fredholm, B. B. (1999). The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-10-04011.1999>
- Tarnopolsky, M., & Cupido, C. (2000). Caffeine potentiates low frequency skeletal muscle force in habitual and nonhabitual caffeine consumers. *Journal of Applied Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.5.1719>
- Umemura, T., Ueda, K., Nishioka, K., Hidaka, T., Takemoto, H., Nakamura, S., Jitsuiki, D., Soga, J., Goto, C., Chayama, K., Yoshizumi, M., & Higashi, Y. (2006). Effects of Acute Administration of Caffeine on Vascular Function. *American Journal of Cardiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.06.058>

- Van Beekvelt, M. C. P., Borghuis, M. S., Van Engelen, B. G. M., Wevers, R. A., & Collier, W. N. J. M. (2001). Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. *Clinical Science*.
<https://doi.org/10.1042/CS20000247>
- Van Thuyne, W., & Delbeke, F. T. (2006). Distribution of caffeine levels in urine in different sports in relation to doping control before and after the removal of caffeine from the WADA doping list. *International Journal of Sports Medicine*.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-872921>
- Venables, M. C., Achten, J., & Jeukendrup, A. E. (2005). Determinants of fat oxidation during exercise in healthy men and women: A cross-sectional study. *Journal of Applied Physiology*.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00662.2003>
- Vera, J., Redondo, B., Molina, R., Bermúdez, J., & Jiménez, R. (2019). Effects of caffeine on intraocular pressure are subject to tolerance: a comparative study between low and high caffeine consumers. *Psychopharmacology*.
<https://doi.org/10.1007/s00213-018-5114-2>
- Watson, J., Deary, I., & Kerr, D. (2002). Central and peripheral effects of sustained caffeine use: Tolerance is incomplete. *British Journal of Clinical Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2002.01681.x>
- Wikoff, D., Welsh, B. T., Henderson, R., Brorby, G. P., Britt, J., Myers, E., Goldberger, J., Lieberman, H. R., O'Brien, C., Peck, J., Tenenbein, M., Weaver, C., Harvey, S., Urban, J., & Doepker, C. (2017). Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food and Chemical Toxicology*.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.002>
- Wilk, M., Krzysztofik, M., Filip, A., Zajac, A., & Del Coso, J. (2019). The effects of high doses of caffeine on maximal strength and muscular endurance in athletes habituated to caffeine. *Nutrients*.
<https://doi.org/10.3390/nu11081912>

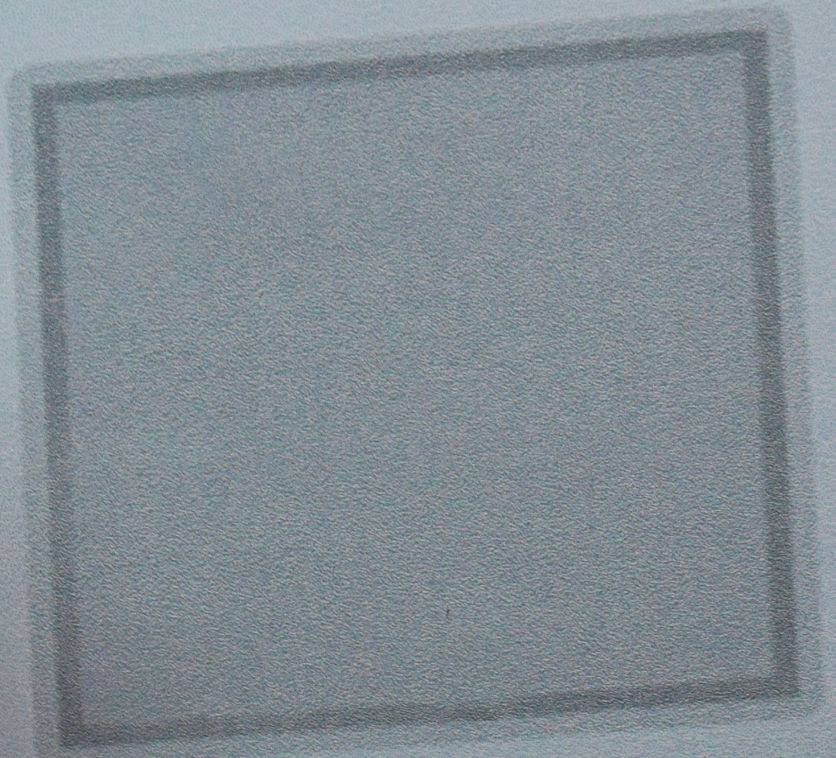
Zhang, Z., Hu, G., Caballero, B., Appel, L., & Chen, L. (2011). Habitual coffee consumption and risk of hypertension: A systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *American Journal of Clinical Nutrition*.

<https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004044>

Zurbuchen, A., Lanzi, S., Voirol, L., Trindade, C. B., Gojanovic, B., Kayser, B., Bourdillon, N., Chenevière, X., & Malatesta, D. (2020). Fat Oxidation Kinetics Is Related to Muscle Deoxygenation Kinetics During Exercise. *Frontiers in Physiology*.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00571>

RESEARCH



Lorem Ipsum is simply dummy text of the printing and typesetting industry. Lorem Ipsum has been

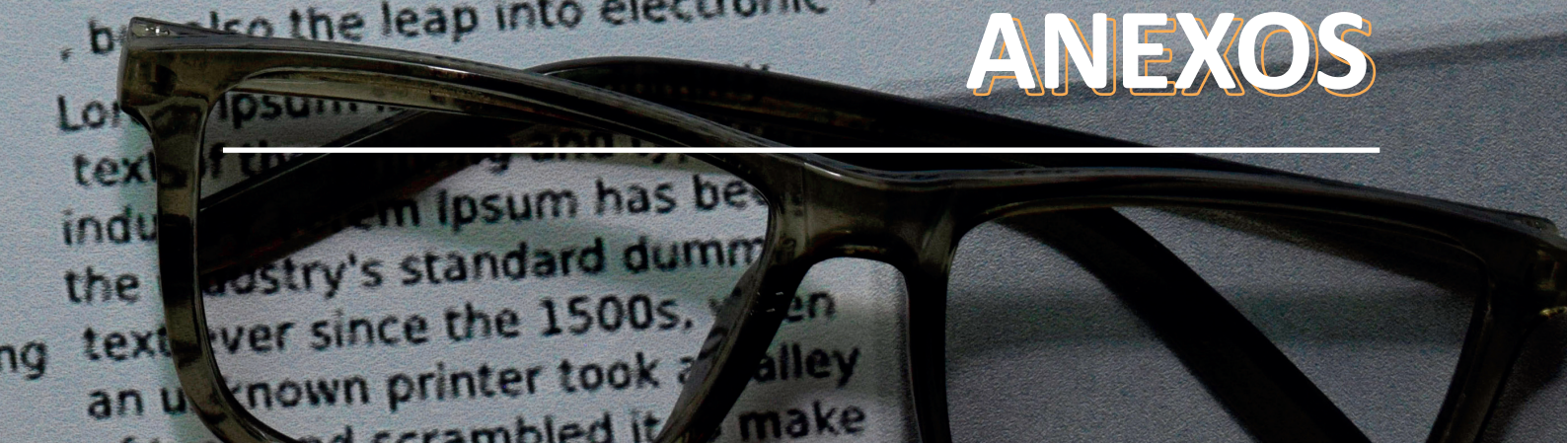


I & DEVELOPMENT

Lorem Ipsum is simply dummy text of the printing and typesetting industry. Lorem Ipsum has been the industry's standard dummy text ever since the 1500s, when an unknown printer took a galley of type and scrambled it to make a type specimen book. It has survived not only five centuries, but also the leap into electronic

Lorem Ipsum is simply dummy text of the printing and typesetting industry. Lorem Ipsum has been the industry's standard dummy text ever since the 1500s, when an unknown printer took a galley of type and scrambled it to make a type specimen book. It has survived not only five centuries, but also the leap into electro

ANEXOS




ANEXO

ARTÍCULO 1

Acute caffeine intake increases muscle oxygen saturation during a maximal incremental exercise test.

Acute caffeine intake increases muscle oxygen saturation during a maximal incremental exercise test

Carlos Ruíz-Moreno¹ | Beatriz Lara¹ | Diego Brito de Souza¹ |
Jorge Gutiérrez-Hellín^{1,2} | Blanca Romero-Moraleda¹ | Ángel Cuéllar-Rayó¹ |
Juan Del Coso³ 

¹Exercise Physiology Laboratory, Camilo José Cela University, Madrid, Spain

²Exercise and Sport Sciences, Faculty of Health Sciences, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Spain

³Centre for Sport Studies, Rey Juan Carlos University, Fuenlabrada, Spain

Correspondence

Juan Del Coso, Camilo José Cela University, Exercise Physiology Laboratory, Madrid, Spain.
Email: juan.delcoso@urjc.es

Aims: The main mechanism behind caffeine's ergogenicity lies in its tendency to bind to adenosine receptors, although other mechanisms might be involved. The aim of this investigation was to analyse the effects of caffeine on muscle oxygen saturation during exercise of increasing intensity.

Methods: Thirteen healthy and active individuals volunteered to participate in a randomized, double blind, placebo-controlled crossover trial. During 2 different trials, participants either ingested a placebo (cellulose) or 3 mg/kg of caffeine. After waiting for 60 min to absorb the substances, participants underwent a maximal ramp cycle ergometer test (25 W/min). Near infrared spectrometers were positioned on each leg's vastus lateralis to monitor tissue O₂ saturation. Blood lactate concentration was measured 1 min after the end of the exercise test.

Results: In comparison to the placebo, the ingestion of caffeine improved the maximal wattage (258 ± 50 vs 271 ± 54 W, respectively, $P < .001$, effect size [ES] = 0.27; 95% confidence interval [CI] 0.14–0.35) and blood lactate concentration (11.9 ± 3.8 vs 13.7 ± 3.5 mmol/L, $P = .029$, ES = 0.38; 95% CI 0.14–0.75) at the end of the test. Caffeine increased muscle oxygen saturation at several exercise workloads with a main effect found in respect to the placebo ($F = 6.28$, $P = .029$; ES = 0.30 to 0.54; 95% CI 0.01–0.78). Peak pulmonary ventilation (124 ± 29 vs 129 ± 23 L/min, $P = 0.035$, ES = 0.25; 95% CI 0.07–0.40) and peak oxygen uptake (3.18 ± 0.70 vs 3.33 ± 0.88 L/min, $P = 0.032$, ES = 0.26; 95% CI 0.08–0.51) were also increased with caffeine.

Conclusion: Acute ingestion of 3 mg/kg of caffeine improved peak aerobic performance and increased peak pulmonary ventilation. In addition, caffeine induced changes in muscle oxygen saturation during submaximal workloads, suggesting that this mechanism might also contribute to caffeine's ergogenic effect.

KEYWORDS

cycling, high intensity exercise, muscle oxygenation, near infrared spectroscopy, VO₂max

The authors confirm that the Principal Investigator for this paper is Juan del Coso and he had direct clinical responsibility for patients.

1 | INTRODUCTION

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a substance naturally found in coffee, tea and cocoa. However, its potent ability to enhance physical performance and wakefulness has favoured the inclusion of this stimulant in several over-the-counter medications and dietary supplements.¹ Caffeine has the capacity to improve performance in a wide-variety of exercise activities when ingested at low-to-moderate doses (3–9 mg/kg body mass^{2,3}). Perhaps, this is the reason why caffeine is ingested by ~80% of competitive athletes.⁴ While the ergogenic effect of caffeine to enhance sports performance is well-recognized,⁵ the physiological origin of caffeine's ergogenicity is poorly understood. The hydrophobic nature of caffeine results in a post-absorption distribution of the substance to all tissues of the body, making it difficult to accurately quantify its key mechanism of action during exercise.⁶

There is a consensus about caffeine antagonism of the adenosine receptors⁷ as the main mechanism behind the performance-enhancing effect of this substance.⁸ Briefly, evidence in animal⁹ and human models¹⁰ supports the ability of caffeine to act as an adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonist, reducing the adenosine-induced effect on neurotransmission and creating a greater dopaminergic drive.⁸ However, the influence of caffeine on exercise performance cannot be only explained by its effects on the brain, as several other central and peripheral mechanisms can aid in producing a more potent ergogenic effect. Other mechanisms, such as reduced muscle pain and perceived exertion,¹¹ central stimulation of the respiratory medullary complex,¹² fatty acid mobilization and oxidation,¹³ and local changes within the exercising muscle such as potassium ion attenuation in the interstitium and calcium iron release from the sarcoplasmic reticulum,^{6,14} have also been proposed to explain caffeine effects on physical performance.

Caffeine also produces an indirect increase in serum adenosine concentration by competitively blocking adenosine receptors.¹⁵ The increased availability of adenosine causes a generalized stimulation of chemoreceptors distributed throughout circulation and creates an increase in the sympathetic tone and the upsurge of circulating catecholamines.¹⁶ Although the direct effects of adenosine on the different vascular systems depend on the type of receptor that is stimulated,¹⁷ the main vascular effect of adenosine is vasodilation of the different blood beds via A_{2A} stimulation. In addition, acute administration of caffeine augments endothelium-dependent vasodilation by way of increased nitric oxide production.¹⁸ Thus, caffeine might directly and indirectly produce vasodilation in the endothelium and in the vascular smooth muscle cells, which leads to increased tissue blood flow and oxygen supply to the exercising muscle during exercise. To the best of our knowledge, there are no investigations that have measured the effect of caffeine on tissue oxygen saturation during exercise. Thus, the aim of the current investigation was to analyse the effects of caffeine on oxygen saturation of the vastus lateralis during cycling of increasing intensity.

What is already known about this subject

- The main mechanism behind caffeine's ergogenicity lies in its tendency to bind to adenosine A₁ and A_{2A} receptors
- However, caffeine is a xanthine that acts on a wide range of molecular targets. Therefore, other mechanisms might contribute to caffeine's ergogenicity.
- Caffeine augments endothelium-dependent vasodilation due to increased nitric oxide production. Then, caffeine might lead to increased tissue blood flow and oxygen supply to the exercising muscle during exercise.

What this study adds

- The acute ingestion of 3 mg of caffeine per kg of body mass was effective in increasing the maximal wattage obtained in a graded cycling test.
- This ergogenic effect was accompanied by increased peak oxygen uptake, blood lactate concentration, and peak pulmonary ventilation.
- Furthermore, a higher caffeine-induced muscle oxygen saturation was found in low-to-moderate workloads, which allowed the obtaining of the end point for muscle oxygen saturation associated to fatigue at higher exercise intensity. This outcome indicates caffeine's ability to enhance oxygen availability in the exercising muscle.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Participants

Thirteen healthy and active (>4 days of training per week; >45 min per day) individuals volunteered to participate in this investigation. They had a mean ± standard deviation age of 32.5 ± 6.5 years, height of 171 ± 8 cm, weight of 65.2 ± 11.4 kg and peak oxygen uptake (VO_{2peak}) of 49.7 ± 8.5 mL/kg/min. There were 7 women in the sample who participated in the entire experiment in their luteal phase. All the participants were light caffeine consumers (<50 mg of caffeine per day), nonsmokers, and did not report any previous history of cardio-pulmonary diseases nor musculoskeletal injuries in the previous 3 months. One week prior to the study, the participants were fully informed of the experimental procedures and gave their informed written consent to participate in the investigation. The study was approved by the Camilo José Cela University Research Ethics Committee.

2.2 | Experimental design

A randomized, double blind, placebo-controlled and crossover experimental design was used in this study. Each participant took part in

2 identical trials that were conducted 48 h apart to allow time for recovery and substance elimination. The participants were randomly assigned to ingest an unidentifiable capsule either filled with 3 mg of caffeine per kg of body mass (Bulk Powders, UK) or with the same amount of cellulose as a placebo (Guinama, Spain). The assigned capsule for each trial was administered with 150 mL of tap water 60 min before the onset of the experimental trials. Each trial consisted of a graded maximal exercise test on a cycle ergometer (SNT Medical, Cardgirus, Spain) until volitional fatigue. Ventilatory variables, heart rate, and muscle oxygen saturation were continuously measured during exercise to assess the effect of caffeine on these variables. An alphanumeric code was assigned to each trial by an individual who was not involved in the study. Investigators and participants were not aware of the assignment of the trials or of the substances under investigation. All trials were performed in a laboratory with constant ambient conditions ($21.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$ and $45 \pm 2\%$ relative humidity). The drug/molecular target nomenclature used in this investigation conforms to the Guide to Pharmacology Nomenclature Classification of the International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) and the British Pharmacological Society (BPS).^{7,19}

2.3 | Experimental protocol

A week prior to the onset of the experiments, participants were familiarized with all the research protocols twice and their body mass was measured (± 50 g, Radwag, Poland) to calculate proper caffeine dosage. During the familiarization protocols, skinfold thickness (Holtain Ltd, Bryberian, Crymmych, Pembrokeshire, UK) was measured in the biceps, triceps, subscapular and supra-iliac areas to calculate body fat,²⁰ and on the vastus lateralis of both legs (right limb = 5.7 ± 2.5 mm, left limb = 5.6 ± 2.0 mm). The day before each experimental trial, participants refrained from all sources of dietary caffeine, from strenuous exercise and alcohol, and adopted a standardized diet and fluid intake. All these standardizations were recorded in a diary during the first trial and later replicated in the second trial.

On the day of the trials, participants arrived at the laboratory at 09.00 in a fed state (at least 3 h have passed after their last meal) and the assigned experimental capsule was provided in an unidentifiable bag. They immediately ingested the capsule with water. Then, they changed into a T-shirt, shorts and cleated shoes, and had a heart rate belt (Wearlink, Polar, Finland) attached to their chest. At this time, a near infrared spectrometer (Moxy, Fortiori Design LLC, Minnesota, USA) was positioned longitudinally on the musculus vastus lateralis of each lower limb, halfway between the greater trochanter and lateral epicondyle of the femur, to monitor tissue O_2 saturation. This device has been shown to be reliable in measuring local oxygen saturation during exercise (intraclass correlation coefficient of 0.77–0.99²¹). The position of each spectrometer was marked with an indelible marking pen to assure inter-day positioning. In addition, the spectrometers were firmly attached to the skin with an elastic tubular net bandage positioned around the thigh (Vendafix, Favesam, Spain). The lack of spectrometer movement was tested during the warm-up. The vastus

lateralis was chosen as the location for the spectrometers because it is a part of the knee extensor group, which is the primary contributor to force production during the down stroke of the pedal²² and it is a typical location used to assess muscle oxygenation during incremental cycling exercise.²³ After this step, the participants rested on a stretcher in a supine position for 60 min to allow for the experimental substance to be absorbed.

After the resting period, participants performed a 10-min standardized warm-up on the cycle ergometer at 50 W and then exercise intensity was progressively increased by 25 W/min (ramp test) until volitional fatigue. The pedalling frequency was individually chosen (between 75 and 90 rpm) but maintained during the whole graded exercise test and replicated in both experimental trials. The seat and handlebar positions on the cycle ergometer were chosen in the familiarization trials and replicated for each individual in both experimental trials. Standardized encouragement and feedback were given to the participants in all trials by the same researcher who was blinded to the treatments.

During the exercise test, pulmonary ventilation, end-tidal oxygen partial pressure and oxygen uptake (VO_2), and heart rate were continuously measured and recorded by means of a breath-by-breath analyser (Metalyzer 3B, Cortex, Germany). Certified calibration gases (16.0% O_2 ; 5.0% CO_2 , Cortex, Germany) and a 3-L syringe were used to calibrate the gas analyser and the flow meter before each trial. In the graded exercise test, maximal wattage (W_{max}) was recorded as the exercise load on the cycle ergometer at the moment that participants abruptly stopped pedalling or when an individual's pedalling frequency was lower than 50 rpm. $\text{VO}_{2\text{peak}}$ was defined as the highest VO_2 value obtained during the test. The absolute value of $\text{VO}_{2\text{peak}}$ in the placebo trial was used to normalize the exercise intensity that represented each workload. For this normalization, the VO_2 of each workload was divided by the individual $\text{VO}_{2\text{peak}}$ in the placebo trial, and the relative load (i.e. % of placebo $\text{VO}_{2\text{peak}}$) was then allocated to the nearest load by using 5% intervals. At each workload, all variables were averaged every 15 s and the last 15 s of each stage were used as a representative value of the workload. The exercise test was considered maximal and valid when the following end criteria were reached at the end of the test: VO_2 stabilized despite increases in ergometric power, the respiratory exchange ratio was >1.10 , participant's rating of perceived exertion (6-to-20 point Borg scale) was >19 points and peak heart rate was $>80\%$ of the age-adjusted estimate of maximal heart rate.²⁴ One minute after the end of the graded test, a blood sample was obtained from a participants' fingertip to analyse blood lactate concentration (Lactate Pro 2, Arkay, Japan).

2.4 | Statistical analysis

The results of each trial were blindly introduced into the statistical package SPSS v 20.0 for later analysis. Differences between the caffeine vs placebo protocols were determined by a 2-way analysis of variance (substance \times workload) with repeated measures. After a significant F test (Geisser–Greenhouse correction for the assumption of

sphericity), differences between the means were identified using Tukey's HSD *post hoc*. The difference in peak values of caffeine vs placebo for all variables was identified with the Student *t*-test for paired samples. The significance level was set at $P < .05$ and all data were presented as means \pm standard deviation. The effect size (ES) and 95% confidence intervals (CI) was also calculated in all pairwise comparisons in which a statistical difference was found, following the formula proposed by Cohen.²⁵

3 | RESULTS

In comparison to the placebo, the ingestion of caffeine improved W_{max} at the end of the ramp test by mean \pm standard deviation $5.2 \pm 3.8\%$ (258 ± 50 vs 271 ± 54 W, respectively, $P < .001$, ES = 0.27; 95% CI 0.14–0.35). In addition, 1 min after the end of the ramp test, blood lactate concentration was increased by $14.3 \pm 3.6\%$ with the ingestion of caffeine (11.9 ± 3.8 vs 13.7 ± 3.5 mmol/L, $P = .029$, ES = 0.38; 95% CI 0.14–0.75). However, the rating of perceived exertion at the end of exercise was very similar, regardless of whether a placebo or caffeine was ingested (19.3 ± 0.9 vs 19.2 ± 1.0 , $P = .800$).

During exercise, there was a main effect of caffeine on muscle oxygen saturation ($F = 6.28$, $P = .029$). The pairwise comparison detected differences between caffeine and placebo at 29 ± 3 ($P = .049$, ES = 0.45; 95% CI 0.01–0.78), 39 ± 3 ($P = .046$, ES = 0.40; 95% CI 0.02–0.70), 51 ± 2 ($P = .018$, ES = 0.43; 95% CI 0.11–0.69) and $61 \pm 3\%$ ($P = .035$, ES = 0.30; 95% CI 0.10–0.46) of placebo VO_{2peak} (Figure 1). Nevertheless, the lowest value of muscle oxygen saturation, obtained at the end of exercise, was not different between treatments (26.8 ± 14.5 vs $26.9 \pm 14.5\%$, $P = .295$). In pulmonary ventilation, a main effect of caffeine was not detected ($F = 0.60$, $P = .460$) but peak pulmonary ventilation was higher with caffeine by $6.1 \pm 8.5\%$ (124 ± 29 vs 129 ± 23 L/min, $P = .035$, ES = 0.25; 95% CI 0.07–0.40; Figure 2). In end-tidal O_2 partial pressure, there was no main effect of caffeine found ($F = 0.10$, $P = .759$) and peak O_2 partial pressure remained unchanged with caffeine (115 ± 5 vs 115 ± 4 mmHg,

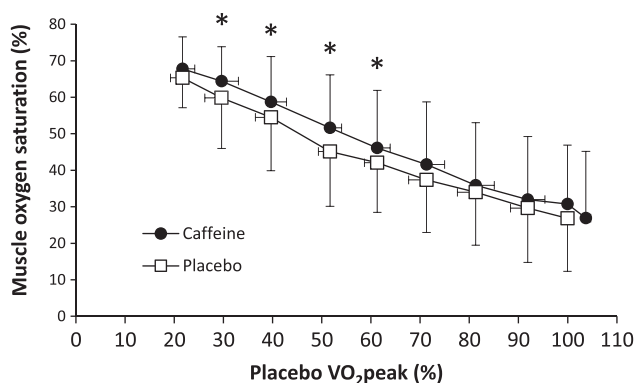


FIGURE 1 Muscle oxygen saturation during a maximal graded cycling test after the ingestion of 3 mg/kg of caffeine or a placebo. Data are mean \pm standard deviation for 13 healthy and active individuals (*) Caffeine different from placebo at $P < .05$

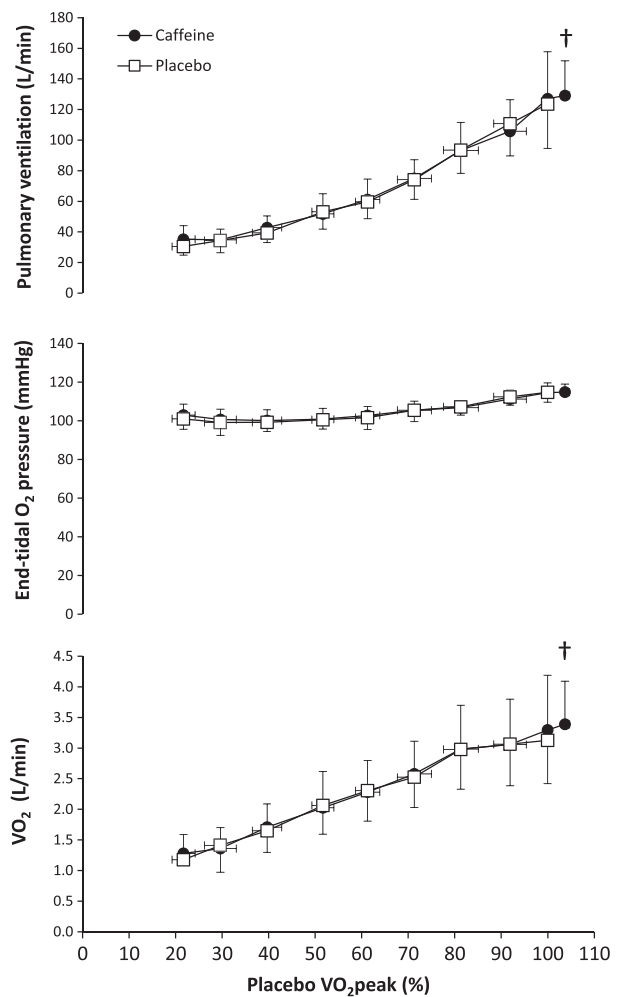


FIGURE 2 Pulmonary ventilation, end-tidal O_2 partial pressure, and O_2 uptake during a maximal graded cycling test after the ingestion of 3 mg/kg of caffeine or a placebo. Data are mean \pm standard deviation for 13 healthy and active individuals. (†) Peak value with caffeine different from peak value with placebo at $P < .05$

$P = .278$). In VO_2 , there was no detected main effect of caffeine ($F = 0.31$, $P = .589$) but VO_{2peak} was increased by $4.5 \pm 10.6\%$ with caffeine (3.18 ± 0.70 vs 3.33 ± 0.88 L/min, $P = .032$; ES = 0.26; 95% CI 0.08–0.51; Figure 2). In regards to heart rate, there was no main effect of caffeine ($F = 3.77$, $P = .110$) and peak heart rate remained unchanged with caffeine (173 ± 11 vs 173 ± 11 beats/min, $P = .403$).

4 | DISCUSSION

The aim of the investigation was to analyse the effects of caffeine on muscle oxygen saturation during a graded maximal cycling test in healthy individuals. This aim was designed to ascertain whether caffeine's ergogenicity during endurance exercise is produced, at least in part, via increased oxygen supply to the exercising muscle, in addition to the well-contrasted mechanism via blockade of adenosine receptors in the brain.⁸ The main outcomes of this investigation indicate

that caffeine increased W_{max} while also enhancing muscle oxygen saturation at 30–60% of VO_{2peak} . Although the caffeine–placebo comparison did not show an effect on muscle oxygen saturation at the highest workloads, the end-point value for muscle oxygen saturation, which characterizes muscle fatigue during cycling,²³ was later obtained and at a higher exercise intensity with caffeine (i.e. 104.5% of placebo VO_{2peak} , Figure 1). The acute ingestion of caffeine also increased VO_{2peak} , peak pulmonary ventilation and postexercise blood lactate concentration, suggesting that the ergogenic effect of caffeine was also accompanied by respiratory and metabolic changes induced by the increased wattage. These results suggest that caffeine's ergogenicity during an incremental cycling exercise relies, at least in part, on an enhanced oxygen availability in the exercising muscle during submaximal workloads drive by this substance. The effect of caffeine to peak aerobic performance and to modulate physiological responses at submaximal exercise intensity probably explains why caffeine has the capacity to increase performance in such a wide range of endurance exercise activities.^{1,26}

The benefits of caffeine ingestion on high-intensity endurance cycling tests have been reported in the literature through original investigations^{27–29} and meta-analysis.^{1,26,30} The magnitude of caffeine's ergogenicity is typically higher in investigations that used time-to-exhaustion endurance protocols than in maximal graded or time trials.^{1,30} Furthermore, it seems that the effect of caffeine on endurance performance is of similar magnitude in men and women²⁷ and may last for up to 15 days when the substance is ingested daily.²⁹ Despite the consistency in the investigations that have reported an ergogenic effect of acute caffeine intake on endurance activities, there is a disparity of findings regarding the mechanism(s) behind the effects of caffeine. Shen *et al.*,¹ through a meta-analysis of 40 articles, have reported that caffeine's ergogenicity increases along with exercise duration. This finding is consistent with that of Silveira *et al.*,²⁸ who indicated that caffeine effects on endurance performance might be linked to an enhanced maintenance of maximal metabolic oxidative pathways. However, other investigations have found caffeine-induced effects on several variables associated with anaerobic energy systems^{31–33} and a direct effect of caffeine on ventilation.¹² In the majority of these investigations, caffeine-induced changes have been related to an effect on the central nervous system via the direct competitive blockade of the adenosine receptors in the brain that inhibits the deleterious effects of adenosine and permits more external work.⁹ Alternatively, caffeine has also been related to a direct effect on increasing muscle force production by way of calcium release from the sarcoplasmic reticulum during muscle contractions and delayed potassium accumulation.⁶

The current manuscript presents an additional mechanism of action that might help to understand the ergogenic effect of caffeine on endurance exercise. In the caffeine trial, muscle oxygen saturation was enhanced with caffeine at 30–60% of VO_{2peak} . Although the statistical significance of this effect disappeared at higher workloads, there was a main effect of caffeine on muscle oxygen saturation in the caffeine trial that indicated higher oxygen availability in the

exercising muscle. While endurance training habitually yields enhanced oxygen utilisation within the muscle, which is translated into lower muscle oxygen saturation,³⁴ the ingestion of caffeine produced higher muscle oxygen saturation, which reflected enhanced blood oxygen supply to the exercising muscle. Interestingly, the end-point of muscle oxygen saturation, obtained in the moment of volitional fatigue, was similar in caffeine and placebo trials despite the workload was significantly higher with caffeine, suggesting that the *margin* of improved tissue oxygenation due to caffeine allowed participants to cycle longer and at a higher exercise intensity in the caffeine trial. Although the causes for the higher muscle oxygen saturation with caffeine are not evident from our data, the unchanged values of pulmonary ventilation, end-tidal oxygen partial pressure, and VO_2 at submaximal workloads suggest that the load of oxygen at the alveolar level and the oxidative capacity of the exercising muscles were not modified with this stimulant. If these 2 factors were likely to be unchanged with caffeine ingestion, the alternative hypothesis for the physiological process that induced higher muscle oxygen saturation might be related to an improved blood flow to the muscle. In fact, this theory has scientific support due to the potential vasodilation effects of caffeine at the endothelial level¹⁸ and on smooth muscle cells,¹⁷ or indirectly through the increased concentration of adenosine once caffeine blocks its receptors in the brain.³⁵ This is the first investigation that shows an effect of caffeine on muscle oxygenation during exercise and requires further investigation.

The current investigation presents some limitations, which should be discussed in order to understand the practical application of the results. First, we used a ramp exercise test to determine the effect of caffeine on muscle oxygen saturation during endurance exercise. However, this protocol of increasing exercise intensity is not representative of any endurance competition. Thus, the efficacy of caffeine in increasing tissue oxygen saturation should be confirmed by using exercise routines more applicable to sports before this mechanism is used to explain the ergogenic effect of caffeine in endurance sports. Second, we placed the near-infrared spectrometers on the vastus lateralis, which only represents a small portion of the muscles involved in pedalling. To assure the effect of caffeine on tissue oxygenation during cycling, the measurement of muscle oxygen content should also be made in other leg muscles. Although the spectrometer used in this investigation is a valid and reliable tool for assessing local oxygen saturation, it has been found that its reliability is reduced along with exercise intensity.²¹ This lower reliability at higher exercise intensities might explain the lack of effect of caffeine on this variable at exercise intensities >60% VO_{2peak} . Last, we used only 1 dose of caffeine (i.e. 3 mg/kg) and thus, we are unable to determine whether there is a dose–response effect of caffeine on muscle oxygen saturation. Despite these limitations, this investigation is innovative and can be used to further the understanding caffeine's ergogenic effect on endurance exercise performance.

In summary, the results of this investigation indicate that the acute ingestion of 3 mg of caffeine per kg of body mass was effective in increasing the maximal wattage obtained in a graded cycling test by $5.2 \pm 3.8\%$. This ergogenic effect was accompanied by increased

VO₂peak, blood lactate concentration, and peak pulmonary ventilation, which represent effects found in previous investigations.^{29,36} Furthermore, a higher caffeine-induced muscle oxygen saturation was found in low-to-moderate workloads, which allowed the obtaining of the end point for muscle oxygen saturation associated to fatigue at higher exercise intensity. The results of this investigation suggest that higher VO₂peak, blood lactate concentration, and peak pulmonary ventilation values with caffeine were the result of the higher wattage obtained in this trial rather than a direct effect of caffeine on these variables. However, caffeine might have the ability to enhance oxygen availability in the exercising muscle during submaximal workloads, which serves as a potential explanation for the well-evidenced ergogenic effect of caffeine on endurance performance. Further investigation is necessary to determine whether this effect of caffeine is present during endurance exercise sports or in high-intensity intermittent disciplines.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the subjects for their invaluable contribution to the study.

CONTRIBUTORS

Carlos Ruiz-Moreno (1,2,3,4,5), Beatriz Lara (1,2,3,6), Diego Brito de Souza (4,6), Angel Cuéllar-Rayó (4,6), Jorge Gutiérrez-Hellín (3,6) and Juan Del Coso (1,2,3,4,5).

(1) Formulated the research question; (2) designed the study; (3) carried it out; (4) analysed the data; (5) wrote the article; (6) revised the article.

COMPETING INTERESTS

The authors of this study have not received any support from any organizations for the submitted work. They do not have any financial relationships with any organizations that might have had an interest in the submitted work in the last 3 years. Lastly, the authors have not been involved in any relationships or activities that could seem to have influenced the submitted work.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Juan Del Coso  <https://orcid.org/0000-0002-5785-984X>

REFERENCES

- Shen JG, Brooks MB, Cincotta J, Manjourides JD. Establishing a relationship between the effect of caffeine and duration of endurance athletic time trial events: a systematic review and meta-analysis. *J Sci Med Sport*. 2019;22(2):232-238. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2018.07.022>
- Salinero JJ, Lara B, Del Coso J. Effects of acute ingestion of caffeine on team sports performance: a systematic review and meta-analysis. *Res Sports Med*. 2019;27(2):238-256. <https://doi.org/10.1080/15438627.2018.1552146>
- Grgic J, Mikulic P, Schoenfeld BJ, Bishop DJ, Pedisic Z. The influence of caffeine supplementation on resistance exercise: a review. *Sports Med*. 2019;49(1):17-30. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0997-y>
- Aguilar-Navarro M, Muñoz G, Salinero JJ, et al. Urine caffeine concentration in doping control samples from 2004 to 2015. *Nutrients*. 2019; 11(2):286. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Urine+Caffeine+Concentration+in+Doping+Control+Samples+from+2004+to+2015>
- Maughan RJ, Burke LM, Dvorak J, et al. IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *Br J Sports Med*. 2018;52(7):439-455. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099027>
- Tallis J, Duncan MJ, James RS. What can isolated skeletal muscle experiments tell us about the effects of caffeine on exercise performance? *Br J Pharmacol*. 2015;172(15):3703-3713. <https://doi.org/10.1111/bph.13187>
- International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) and the British Pharmacological Society (BPS). caffeine[Ligand page] IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY. <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?ligandId=407>. Accessed October 3, 2019.
- Meeusen R, Roelands B, Spriet LL. Caffeine, Exercise and the Brain. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2013;76:1-12. <https://doi.org/10.1159/000350223>
- Davis JM, Zhao Z, Stock HS, Mehl KA, Buggy J, Hand GA. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2003;284(2):R399-R404. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00386.2002>
- Elmenhorst D, Meyer PT, Matusch A, Winz OH, Bauer A. Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET. *J Nucl Med*. 2012;53(11):1723-1729. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.105114>
- Glaister M, Gissane C. Caffeine and physiological responses to submaximal exercise: a meta-analysis. *Int J Sports Physiol Perform*. 2018; 13(4):402-411. <https://doi.org/10.1123/ijsp.2017-0312>
- Chapman RF, Stager JM. Caffeine stimulates ventilation in athletes with exercise-induced hypoxemia. *Med Sci Sports Exerc*. 2008;40(6): 1080-1086. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181667421>
- Gutiérrez-Hellín J, Del Coso J. Effects of p-Synephrine and caffeine ingestion on substrate oxidation during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2018;50(9):1899-1906. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001653>
- Davis JK, Green JM. Caffeine and anaerobic performance: ergogenic value and mechanisms of action. *Sports Med*. 2009;39(10):813-832. <https://doi.org/10.2165/11317770-000000000-00000>
- Conlay LA, Conant JA, deBros F, Wurtman R. Caffeine alters plasma adenosine levels. *Nature*. 1997;389(6647):136-136. <https://doi.org/10.1038/38160>
- Biaggioni I, Olafsson B, Robertson RM, Hollister AS, Robertson D. Cardiovascular and respiratory effects of adenosine in conscious man. Evidence for chemoreceptor activation. *Circ Res*. 1987;61(6):779-786. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3677336>
- Echeverri D, Montes FR, Cabrera M, Galán A, Prieto A. Caffeine's vascular mechanisms of action. *Int J Vasc Med*. 2010;2010:1-10. <https://doi.org/10.1155/2010/834060>
- Umemura T, Ueda K, Nishioka K, et al. Effects of acute Administration of Caffeine on vascular function. *Am J Cardiol*. 2006;98(11):1538-1541. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.06.058>
- Alexander SP, Kelly E, Marion NV, et al. The concise guide to pharmacology 2017/18: overview. *Br J Pharmacol*. 2017;174:S1-S16. <https://doi.org/10.1111/bph.13882>
- Stewart A, Marfell-Jones M, *International Society for Advancement of Kinanthropometry. International Standards for Anthropometric Assessment*. Rev. 2006. Potchefstroom South Africa: International Society

- for the Advancement of Kinanthropometry; 2011. <https://www.worldcat.org/title/international-standards-for-anthropometric-assessment/oclc/869687146>.
21. Crum EM, O'Connor WJ, Van Loo L, Valckx M, Stannard SR. Validity and reliability of the Moxy oxygen monitor during incremental cycling exercise. *Eur J Sport Sci*. 2017;17(8):1037-1043. <https://doi.org/10.1080/17461391.2017.1330899>
 22. Raasch CC, Zajac FE, Ma B, Levine WS. Muscle coordination of maximum-speed pedaling. *J Biomech*. 1997;30(6):595-602.
 23. Racinais S, Buchheit M, Girard O. Breakpoints in ventilation, cerebral and muscle oxygenation, and muscle activity during an incremental cycling exercise. *Front Physiol*. 2014;5:142. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3990045/>
 24. Edvardsen E, Hem E, Anderssen SA. End criteria for reaching maximal oxygen uptake must be strict and adjusted to sex and age: a cross-sectional study. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e85276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085276>
 25. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Second. LAWRENCE ERLBAUM ASSOCIATES; 1988. <https://content.taylorfrancis.com/books/download?dac=C2010-0-30830-5&isbn=9781134742707&format=googlePreviewPdf>.
 26. Southward K, Rutherford-Markwick KJ, Ali A. The effect of acute caffeine ingestion on endurance performance: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med*. 2018;48(8):1913-1928. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0939-8>
 27. Skinner TL, Desbrow B, Arapova J, et al. Women experience the same ergogenic response to caffeine as men. *Med Sci Sports Exerc* January 2019;1. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001885>, 6, 1195, 1202
 28. Silveira R, Andrade-Souza VA, Arcoverde L, et al. Caffeine increases work done above critical power, but not anaerobic work. *Med Sci Sports Exerc*. 2018;50(1):131-140. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001408>
 29. Lara B, Ruiz-Moreno C, Salinero JJ, Del Coso J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. Sandbakk Ø, ed. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275>
 30. Doherty M, Smith PM. Effects of caffeine ingestion on exercise testing: a meta-analysis. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2004;14(6):626-646. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657469>
 31. Doherty M. The effects of caffeine on the maximal accumulated oxygen deficit and short-term running performance. *Int J Sport Nutr*. 1998;8(2):95-104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9637189>
 32. Simmonds MJ, Minahan CL, Sabapathy S. Caffeine improves supra-maximal cycling but not the rate of anaerobic energy release. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109(2):287-295. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1351-8>
 33. Lara B, Ruiz-Vicente D, Areces F, et al. Acute consumption of a caffeinated energy drink enhances aspects of performance in sprint swimmers. *Br J Nutr*. 2015;114(6):908-914. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002573>
 34. Kime R, Niwayama M, Kaneko Y, et al. Muscle Deoxygenation and Its Heterogeneity Changes After Endurance Training. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 923. ; 2016:275-281. https://doi.org/10.1007/978-3-319-38810-6_37
 35. Ballard HJ. ATP and adenosine in the regulation of skeletal muscle blood flow during exercise. *Acta Physiol Sin*. 2014;66(1):67-78.
 36. Chapman RF, Mickleborough TD. The effects of caffeine on ventilation and pulmonary function during exercise: an often-overlooked response. *Physician Sport Med*. 2009;37(4):97-103. <https://doi.org/10.3810/psm.2009.12.1747>

How to cite this article: Ruíz-Moreno C, Lara B, Brito de Souza D, et al. Acute caffeine intake increases muscle oxygen saturation during a maximal incremental exercise test. *Br J Clin Pharmacol*. 2020;86:861-867. <https://doi.org/10.1111/bcp.14189>

ANEXO ARTÍCULO 2

Caffeine increases whole-body fat oxidation
during 1 h of cycling at *fatmax*.



Caffeine increases whole-body fat oxidation during 1 h of cycling at Fatmax

Carlos Ruiz-Moreno¹ · Jorge Gutiérrez-Hellín² · Francisco J. Amaro-Gahete¹ · Jaime González-García¹ · Verónica Giráldez-Costas^{1,3} · Víctor Pérez-García¹ · Juan Del Coso⁴

Received: 5 June 2020 / Accepted: 21 September 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose The ergogenic effect of caffeine on exercise of maximum intensity has been well established. However, there is controversy regarding the effect of caffeine on shifting substrate oxidation at submaximal exercise. The aim of this study was to investigate the effect of acute caffeine ingestion on whole-body substrate oxidation during 1 h of cycling at the intensity that elicits maximal fat oxidation (Fatmax).

Methods In a double-blind, randomized, and counterbalanced experiment, 12 healthy participants ($VO_{2\max} = 50.7 \pm 12.1$ mL/kg/min) performed two acute experimental trials after ingesting either caffeine (3 mg/kg) or a placebo (cellulose). The trials consisted of 1 h of continuous cycling at Fatmax. Energy expenditure, fat oxidation rate, and carbohydrate oxidation rate were continuously measured by indirect calorimetry.

Results In comparison to the placebo, caffeine increased the amount of fat oxidized during the trial (19.4 ± 7.7 vs 24.7 ± 9.6 g, respectively; $P = 0.04$) and decreased the amount of carbohydrate oxidized (94.6 ± 30.9 vs 73.8 ± 32.4 g; $P = 0.01$) and the mean self-perception of fatigue (Borg scale = 11 ± 2 vs 10 ± 2 arbitrary units; $P = 0.05$). In contrast, caffeine did not modify total energy expenditure (placebo = 543 ± 175 ; caffeine = 559 ± 170 kcal; $P = 0.60$) or mean heart rate (125 ± 13 and 127 ± 9 beats/min; $P = 0.30$) during exercise. Before exercise, caffeine increased systolic and diastolic blood pressure whilst it increased the feelings of nervousness and vigour after exercise ($P < 0.05$).

Conclusion These results suggest that a moderate dose of caffeine (3 mg/kg) increases the amount of fat oxidized during 1 h of cycling at Fatmax. Thus, caffeine might be used as an effective strategy to enhance body fat utilization during submaximal exercise. The occurrence of several side effects should be taken into account when using caffeine to reduce body fat in populations with hypertension or high sensitivity to caffeine.

Keywords Endurance exercise · Substrate oxidation · Adverse effects · Stimulant · Performance

Introduction

Caffeine (1,3,7 trimethylxanthine) is a natural alkaloid with a potent ergogenic effect on several forms of maximum intensity exercise [1]. To this regard, a myriad of experiments have confirmed that acute caffeine intake, in a dose between 3 and 9 mg per kg of body mass, has the capacity of increasing the work produced during a wide spectrum of exercise and sport situations [2, 3]. The strong evidence supporting the ergogenic effect of caffeine has led the inclusion of this substance in the list of dietary supplements with good-to-strong evidence of achieving benefits to performance of the International Olympic Committee [4]. There is ample consensus to consider the antagonistic role of caffeine on adenosine A_1 , A_{2A} and A_{2B} receptors as the main

✉ Juan Del Coso
juan.delcoso@urjc.es

¹ Exercise Physiology Laboratory, Camilo José Cela University, Madrid, Spain

² Faculty of Education, Francisco de Vitoria University, Madrid, Spain

³ Department of Physical Education, Sport and Human Movement, Autonomus University of Madrid, Madrid, Spain

⁴ Centre for Sport Studies, Rey Juan Carlos University, Camino del Molino, s/n, 28943 Fuenlabrada, Spain

mechanism behind its ergogenic effects [5], although other alternative mechanism has been proposed such as increased muscle oxygen saturation, potassium ion attenuation in the interstitium and calcium iron release from the sarcoplasmic reticulum [6–8]. The capacity of caffeine to enhance fat oxidation while reducing carbohydrate utilization during endurance exercise has also been proposed as an beneficial effect of acute caffeine intake [9], although its impact to enhance exercise of maximal exercise intensity may be limited to endurance exercise situations in which glycogen sparing is associated to enhanced performance. Nevertheless, the potential capacity of caffeine to increase fat oxidation during exercise of submaximal exercise intensity may be associated to other benefits beyond exercise and sport performance, such as a more effective body fat reduction in individuals involved in exercise programmes to promote weight loss.

The capacity of caffeine to shifting substrate oxidation during endurance exercise of submaximal intensity is perhaps the most debated effect of caffeine despite it was the main finding of one of the pivotal investigations on this topic [10]. Since then, contradictory outcomes have been published in favour or against caffeine's effectiveness to increase fat oxidation during exercise, perhaps because some investigations used protocols to measure both ergogenic and substrate oxidation effects of caffeine at the same time. To this regard, the increase in exercise performance induced by caffeine may counteract the effect of caffeine on substrate oxidation, as exercise intensity is the main modulator for the use of fat and carbohydrate during endurance exercise [11].

On one hand, several investigations have found that acute caffeine intake (3–9 mg/kg) was did not modify fat oxidation during exercise [12–16]. In comparison, other investigations have found that caffeine increased fat oxidation rate during exercise of moderate intensity when using similar dosages and exercise protocols [17–22]. The divergence of these investigations' outcomes might be associated with the experimental protocols used to test the effect of caffeine on substrate oxidation. Investigations of the former [12–16] aimed to assess the ergogenic effect of caffeine and thus, investigators used time trials with freely-chosen wattage or fixed wattage at > 70% of participants' maximal oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{max}}$). In the latter investigations [17–22], the main objective was to assess the effect of caffeine on fuel utilization during exercise of submaximal intensity; therefore it were used exercise protocols with lower exercise intensities and fixed wattage. Thus, it seems necessary to select exercise of submaximal intensity, in addition to exercise protocols with fixed wattage, to properly study the effect of caffeine on substrate utilization.

From a practical perspective, the most effective manner of maximizing fat oxidation during submaximal exercise is by selecting the exercise intensity that produces maximum rates of fat oxidation (i.e., Fatmax; [23]) and maintaining

this selected intensity over time [24]. Typically, fat oxidation becomes maximal at moderate exercise intensity, where most of the energy demands can be satisfactorily met by fat oxidation [9]. However, no investigation has studied the effect of acute caffeine intake on substrate oxidation during continuous exercise at the intensity that elicits peak fat oxidation. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of caffeine on fat and carbohydrate oxidation during 1 h of cycling at Fatmax.

Methods

Participants

Twelve young and healthy participants (8 men and 4 women) volunteered to participate in the study (age = 29 ± 6 years, body mass = 70.2 ± 9.2 kg, height = 1.75 ± 0.08 m, maximal oxygen uptake [$\text{VO}_{2\text{max}}$] = 50.7 ± 12.1 mL/kg/min). A pre-experimental sample size calculation indicated that at least 11 participants were needed to obtain statistically significant differences when fat oxidation rate was 0.12 g/min higher with caffeine than with the placebo. The sample size calculation was based on the effect of acute caffeine intake when cycling at Fatmax [9], and it was designed to obtain a statistical power of 80% with type I error set at 5%. Participants fulfilled the following inclusion criteria: (a) age between 18 and 40 years; (b) consistent recreational exercise training of ~ 1 h/day, at least 4 days/week for the previous two months; (c) low habitual caffeine consumption (i.e., < 50 mg of caffeine per day in the previous 3 months), as defined by Filip et al. [25]; (d) in women, regular duration of their menstrual cycle for the previous 4 months. Participants were excluded if they reported (a) any type of lower limb injury within the previous two months; (b) a positive smoking status; (c) medication or dietary supplement usage within the previous month; (d) a previous history of cardiopulmonary diseases, (e) oral contraceptive use; (f) allergy to caffeine; (g) in women, any type of menstrual disorders. Women performed all experimental trials during their luteal phase to avoid the influence of the menstrual cycle on the results of the investigation despite evidence suggests that fuel oxidation during submaximal intensity exercise [26, 27] and the response to acute caffeine intake during exercise are similar across the menstrual cycle [28, 29]. Before enrolment in the study, all participants were fully informed of the experimental procedures and risks and signed an informed written consent. The study was approved by the Camilo José Cela University Research Ethics Committee and was conducted in accordance with the last version of the Declaration of Helsinki.

Experimental design

A double-blind, placebo-controlled, randomized, and counterbalanced experimental design was used in this investigation. Each participant took part in two identical experimental trials separated by at least three days. In these trials, participants either ingested 3 mg of caffeine per kg of body mass (Bulk Powders, United Kingdom) or 3 mg/kg of placebo (cellulose, Guinama, Spain). A dose of 3 mg/kg of caffeine was selected as this dosage has been found effective to increase fat oxidation at Fatmax [9]. The treatments were ingested in identical, unidentifiable capsules 60 min before the onset of exercise. An alphanumeric code was assigned to each trial by a researcher independent of the study in order to double-blind the participants and investigators to the tested substances. This alphanumeric code was only unveiled after the trials had been analysed. Each trial consisted of 1 h of continuous cycling at Fatmax while energy expenditure and substrate oxidation of carbohydrates and fat were continuously measured by indirect calorimetry. One hour of continuous cycling at Fatmax was selected as the exercise protocol to assess the effect of caffeine on fat oxidation during exercise because this same protocol has been effective at detecting differences in fat oxidation after the ingestion of other phytochemicals [24]. The trials were performed in a laboratory room with controlled ambient temperature (20.3 ± 0.4 °C) and relative humidity ($31 \pm 11\%$).

Pre experimental trial

Participants performed two pre-experimental trials: one maximal cycling test to obtain Fatmax and VO_{2max} during a cycling test of increasing intensity and one familiarization trial. One week before the start of the experiment, participants underwent a maximal cycling test until volitional fatigue. This test was preceded by a standardized warm-up (i.e. 10 min at 50 W for men, and 30 W for woman) on a cyclergometer (SNT medical, Cardgirus, Spain). After the warm-up, the workload was increased by 25 W for men and 15 W for women every 3 min until the respiratory exchange ratio reached 1.0. Thereafter, incremental loads were produced every minute until the participant reached volitional exhaustion. Participants were instructed to maintain a cycle cadence of 70–90 rpm during the whole test. The maximal exercise test finished when participants were unable to maintain a cycle cadence > 50 rpm or when they stopped pedalling due to fatigue. During the maximal exercise test, oxygen uptake (VO_2) and carbon dioxide production (VCO_2) were measured breath by breath by a gas analyser (Metalyzer 3B, Cortex, Germany) and substrate oxidation rates were calculated at each stage with stoichiometric calculations. In this test, the intensity that produced the maximal rate of fat oxidation was registered and used for the experimental trials

(Fatmax; mean \pm standard deviation was 108 ± 50 W). Three days before the first experimental trial, participants underwent a familiarization trial that replicated the protocols of the experimental trials, as explained below.

Standardizations

Once the participants fulfilled the inclusion/exclusion criteria, they were informed about the necessity of refraining from all sources of caffeine (coffee, tea, chocolate, energy drinks, etc.) until the experiment was completed. Participants were also encouraged to maintain their training routines and a stable state of physical fitness during the experiment. The day before each trial, participants performed light, standardised training and a self-selected precompetitive diet/fluid routine was kept. Fluid and diet guidelines were given to assure carbohydrate availability [30] and euhydration [31] in all experimental trials. Subjects were also required to refrain from consuming alcohol and to maintain a sleeping pattern with at least 8 h of sleep the day before each trial. These standardisations were written in a personal journal and were repeated thoroughly the day before the second trial. Data on diet and exercise were analysed afterwards to ensure that participants fulfilled all the recommendations given and euhydration was certified by urine specific gravity < 1.020 before each testing (MASTER-SUR/N α , Atago, Japan). In women, regularity and duration of the menstrual cycle were monitored in each participant for 4 months through a free mobile application (Mycalendar[®], Period-tracker, US).

Experimental trials

On the day of the experimental trials, participants arrived at the laboratory in the morning (09.00 am) in a fasted state (at least 8 h after their last meal). Upon arrival, the capsule with the experimental treatment (caffeine or placebo) was provided and ingested by the participant with 150 mL of water. Then, participants rested supine for 60 min to allow for substance absorption. In the last 5-min of the resting period, participants' blood pressure (M6 Comfort, Omron, Japan; by triplicate) and heart rate (Wearlink + V800, Polar, Finland) were recorded. An average of three blood pressure measurements, performed with 1 min between measurements, was used for analysis. Thereafter, participants underwent a standardized 10-min warm-up with increasing intensity until they reached their individual Fatmax (equivalent to $52.1 \pm 9.8\%$ of their VO_{2max}). The cyclergometer was set to maintain this exercise intensity and participants pedalled at this intensity for 1 h. The position of the saddle and handlebar in the cyclergometer, clothing used, and cycling cadence were meticulously replicated in both trials. VO_2 and VCO_2 data were obtained breath by breath during the whole trial with the gas analyser used for the VO_{2max} test. VO_2

and VCO_2 data within the last 60 s of each 5-min period was used as a representative value. During the last 60 s of each 5-min period, participants were instructed to maintain a stable position and cadence. The rates of energy expenditure and substrate oxidation were calculated from VO_2 and VCO_2 using the non-protein respiratory quotient [32]. Data on VO_2 and VCO_2 for the whole trial (i.e., all the breaths included in the 1-h cycling trial) were used for the calculation of the total amount of energy expended and total amounts of fat and carbohydrate oxidized. During exercise, heart rate and participants' rating of perceived exertion (6–20 arbitrary units (a.u.) scale [33]) were recorded at 5-min intervals.

After the end of the trials, participants completed an ad hoc questionnaire regarding common side effects after acute caffeine intake. This questionnaire included a 1- to 10-point scale to assess each item. Participants were previously informed that one point meant a minimal amount of that item and 10 points meant a maximal amount. Participants were provided with an online version of this questionnaire via WhatsApp, and the questionnaire contained two phases. In the first phase, participants had to rate their feelings of nervousness, vigour, irritability, gastrointestinal problems, muscular pain, headache, and diuresis and they completed these questionnaire 12 h after the end of exercise to assess the intensity of the side effects induced by acute caffeine intake in the day of the experiment. In the second phases of the questionnaire, participants rated their level of insomnia during the night after the experimental trial. This survey was completed in the following morning of the experiment once participants had completed their night sleep. This two-phases survey has been effectively used to assess side effects resulting from acute caffeine ingestion in individuals performing several exercise situations [34, 35].

Statistical analysis

The study data were blindly introduced into the statistical package SPSS (SPSS, v. 22.0, IBM SPSS Statistics, IBM Corporation) and subsequently analysed. The Shapiro–Wilk test was used to confirm the normality of the quantitative variables and, consequently, parametric statistics test were used to determine differences among trials. A two-way analysis of variance (ANOVA) (substance \times time) was performed to analyse the main effect of caffeine on all the variables under investigation. After a significant F test (Greenhouse–Geisser correction for the assumption of sphericity) was completed for the main effect of caffeine, differences in the caffeine-placebo comparisons at each 5-min measurement were identified by LSD post-hoc tests. Paired *t*-tests were used to detect differences in the caffeine-placebo comparison in resting heart rate, resting blood pressure, overall values of energy expenditure, fat and carbohydrate oxidation during exercise, and in side-effect ratings post-exercise. In

all statistical tests, a significance level of $P < 0.05$ was set. The data are presented as mean \pm standard deviation. The effect size ($\pm 95\%$ confidence intervals (CI)) was calculated in all pairwise comparisons [36]. The smallest significant effect threshold was set as 0.2, and a qualitative descriptor was included to represent the likelihood of exceeding this threshold. Ranges of likelihood $< 1\%$ indicated almost certainly no chances of change; 1% to 5%, very unlikely; 5% to 25%, unlikely; 25% to 75%, possible; 75% to 95%, likely; 95% to 99%, very likely; $> 99\%$, most likely. Differences were rated as unclear when likelihood exceeded $> 5\%$ in both positive/negative directions [37].

Results

Before exercise, the acute ingestion of caffeine increased systolic, diastolic, and mean arterial blood pressure in comparison to the ingestion of the placebo (Table 1; $P < 0.05$). However, caffeine did not modify resting heart rate ($P = 0.62$).

During exercise, there was a significant effect of caffeine on fat oxidation rate ($P = 0.02$). The post-hoc analysis revealed that the rate of fat oxidation was higher with caffeine than with the placebo in all pairwise comparisons during the 1-h cycling trial (all $P < 0.05$, Fig. 1a). Moreover, there was a main effect of caffeine on carbohydrate oxidation rate ($P = 0.02$) while the post-hoc analysis revealed that caffeine decreased carbohydrate oxidation rate from min-10 to min-60 (all $P < 0.05$, Fig. 1b). However, there was no main effect of caffeine on energy expenditure ($P = 0.60$; Fig. 1c). As a whole, caffeine increased the total amount of fat oxidized during the trial when compared to the placebo (Table 1; $P = 0.04$) while reducing the amount of carbohydrates utilized ($P < 0.01$). The ingestion of caffeine did not modify the amount of energy expended during the trial ($P < 0.71$).

During exercise, there was a main effect of caffeine on the rating of perceived exertion ($P = 0.05$) with the post-hoc analysis demonstrating that the rating of perceived exertion was lower with caffeine than with the placebo from min-45 to min-60 (all $P < 0.05$, Fig. 2a). In addition, there was a main effect of caffeine on VO_2 ($P = 0.03$) with the post-hoc analysis indicating that VO_2 was higher with caffeine than with the placebo at several time-points during exercise (all $P < 0.05$, Fig. 2b). However, there was no main effect of caffeine on heart rate ($P = 0.20$; Fig. 2c).

After exercise, participants reported higher ratings of nervousness and vigorousness in the caffeine trial vs the placebo trial (Table 2; $P < 0.05$). Although there were no statistical differences in the remaining side effects, the effect sizes of acute caffeine on gastrointestinal distress, diuresis, and insomnia were > 1.0 .

Table 1 Cardiovascular variables at rest, and energy expenditure and substrates oxidized during 1 h of cycling at the intensity that elicits maximal fat oxidation (Fatmax) after the ingestion of caffeine or a placebo

	Variables (units)	Placebo	Caffeine	Effect Size (95% CI)	Qualitative inference	P value
Resting	Heart rate (beats/min)	54 ± 9	55 ± 9	0.2 (− 0.3/0.6)	Unclear	0.62
	Systolic blood pressure (mmHg)	116 ± 13	124 ± 20	0.5 (0.2/0.8)	Very likely	0.01
	Diastolic blood pressure (mmHg)	71 ± 10	74 ± 11	0.3 (0.1/0.6)	Likely	0.02
	Mean blood pressure (mmHg)	86 ± 10	91 ± 13	0.5 (0.2/0.7)	Very likely	0.01
Exercise	Total fat oxidation (g)	19.4 ± 7.7	24.7 ± 9.6	0.5 (0.1/0.9)	Likely	0.04
	Total carbohydrate oxidation (g)	94.6 ± 30.9	73.8 ± 32.4	− 0.8 (− 1.4/− 0.3)	Very likely	<0.01
	Total energy expenditure (kcal)	543 ± 175	559 ± 170	0.0 (− 0.2/0.1)	Very likely	0.71
	Mean heart rate (beats/min)	125 ± 13	127 ± 9	0.2 (− 0.1/0.4)	Possible	0.30
	Mean respiratory exchange ratio	0.89 ± 0.04	0.85 ± 0.05	− 1.1 (− 1.9/− 0.4)	Very likely	0.04

Data is shown as mean ± SD for 12 healthy participants

CI confidence interval

Discussion

The main outcomes of this research evidenced the potential effects of caffeine, when ingested on a moderate dose (3 mg/kg) before exercise, on shifting substrate oxidation during exercise towards a higher reliance of fat as a fuel source. The effect of caffeine was evident during all time comparisons, suggesting that caffeine's effectiveness at enhancing fat oxidation was present from the beginning to the end of the exercise trial. As a result, caffeine increased the amount of fat oxidized during 1 h of cycling at Fatmax by 27.0%. Interestingly, the higher fat oxidation associated with caffeine was accompanied by an associated caffeine-induced reduction in total carbohydrate oxidation (−22.0%), with no differences in energy expenditure. Despite caffeine's potential benefit in shifting substrate oxidation during exercise, the intake of caffeine was associated with two drawbacks: the increase in systolic and diastolic blood pressure before exercise and the increase in the self-reported ratings of several side-effects in the 24 h after exercise. Together, this information suggests that caffeine might be considered as an effective substance to augment fat oxidation during continuous exercise at submaximal intensity. However, caffeine might not be recommended to individuals with hypertension or excessive sensitivity to caffeine-related side effects.

After acute ingestion, caffeine is rapidly absorbed. As a result of its lipophilic nature, it passes through all biological membranes, including the blood–brain barrier [38]. In this regard, there is ample consensus to consider the antagonistic role of caffeine as the main mechanism behind its ergogenic effects, primarily due to its interactions with adenosine A₁, A_{2A} and A_{2B} receptors in the central nervous system [5]. Caffeine can also exert effects during submaximal exercise via increased release of epinephrine, mobilization of fatty acids from adipose tissue, [12, 13] and increased muscle oxygen saturation [8]. These effects might allow for a higher

availability of fatty acids and oxygen to allow for a higher reliance of fat oxidation as a fuel. Yet, it also seems that caffeine's effect on fat oxidation might be at the mercy of exercise intensity.

Exercise intensity is the main determinant for the body's selection between fat and carbohydrates as energy sources during exercise. It is also worth noting that exercise duration, environmental conditions, training status, and pre-exercise diet can also influence fat oxidation levels during exercise [39]. Overall, fat oxidation rate increases with exercise intensity until moderate exercise intensity. It then abruptly decreases with further increases in exercise intensity, once the maximal fat oxidation rate is obtained to produce a U-shaped curve that associates exercise intensity and fat oxidation rate [23]. Previous investigations have determined that the maximal rate of fat oxidation is obtained around 40 to 75% of VO_{2max}, although differences might be found between trained and untrained individuals [23, 40]. In the investigations where caffeine did not change substrate oxidation during exercise, the exercise intensity was > 70% VO_{2max} [12–14] or it was freely chosen during a time trial [15, 16]. In contrast, the investigations where caffeine increased fat oxidation during exercise used exercise intensities between 50 and 65% VO_{2max} [17–20], or equivalent to Fatmax [21], or equivalent to the participants' maximal lactate steady state [22]. In this investigation, participants cycled at Fatmax, which represented 52.1 ± 9.8% of the participants' VO_{2max}. By pooling all these outcomes, it can be inferred that caffeine may enhance fat oxidation during submaximal endurance exercise with intensities close to or below Fatmax. In contrast, in intensities above Fatmax, caffeine may be ineffective in changing substrate oxidation. This inference is supported by a recent investigation that tested the effect of acute caffeine intake on fat oxidation during a ramp exercise test [9]. In that investigation, caffeine increased fat oxidation during exercise at 30-to-70%

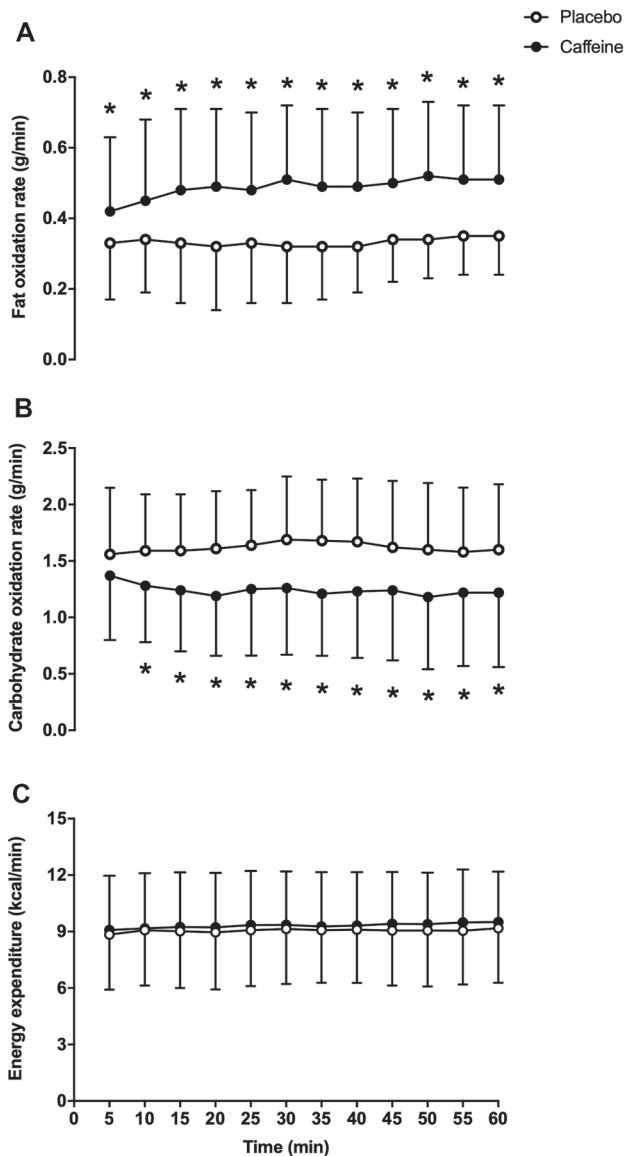


Fig. 1 Fat oxidation rate (a), carbohydrate oxidation rate (b), and energy expenditure rate (c) during 1 h of cycling at the intensity that elicits maximal fat oxidation (Fatmax) after the ingestion of caffeine or the placebo. (*) Significant differences between caffeine and placebo at $P < 0.05$

VO_{2max} , but was unable to affect substrate oxidation when exercise intensity was $\geq 80\%$ VO_{2max} . These outcomes suggest that caffeine may increase the reliance on fat as a fuel at Fatmax. At higher exercise intensities, caffeine will exert an ergogenic effect [10, 12, 15], which is independent of changes on substrate oxidation.

Another interesting finding of this investigation is the effect of caffeine on reducing the ratings of perceived exertion during exercise, particularly at the end of exercise. Due to the blockage of adenosine receptors, caffeine indirectly augments the release of norepinephrine, dopamine,

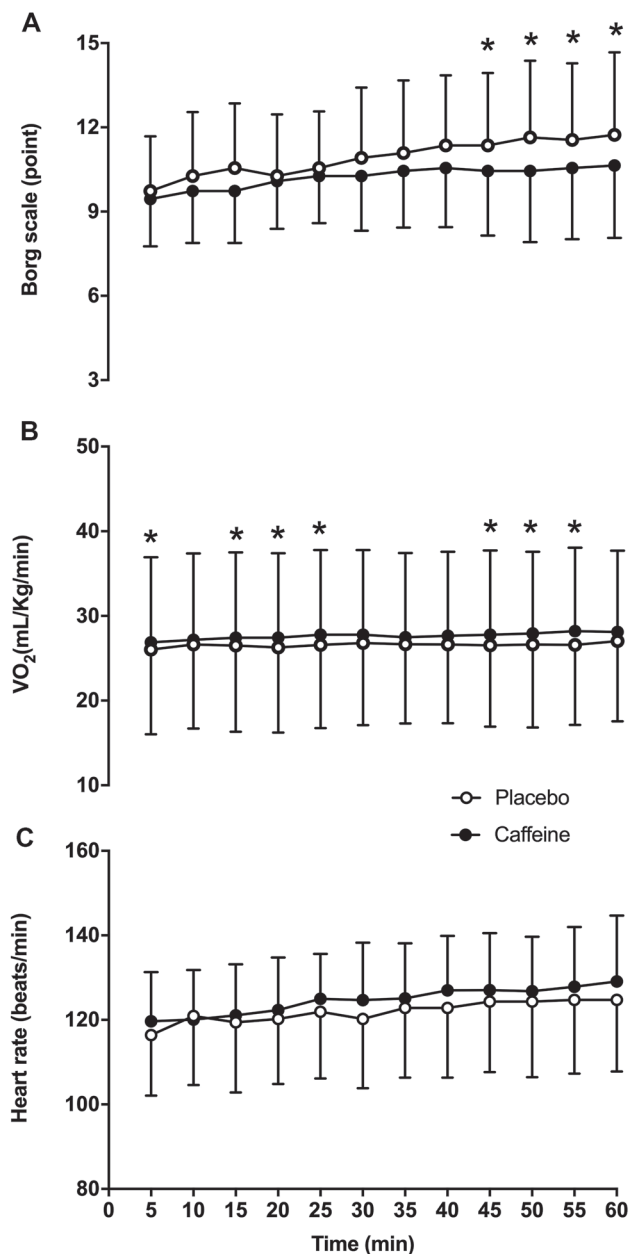


Fig. 2 Self-reported rating of perceived exertion (a), VO_2 (b), and heart rate (c) during 1 h of cycling at the intensity that elicits maximal fat oxidation (Fatmax) after the ingestion of caffeine or placebo. (*) Significant differences between caffeine and placebo at $P < 0.05$. VO_2 : oxygen uptake

acetylcholine, and serotonin [41]. The release of these neurotransmitter produces a scenario for dampened pain during exercise, blunting perceived exertion [42]. A meta-analysis associating the effect of caffeine on self-reported fatigue and ergogenicity found that caffeine's effect on reducing the rating of perceived exertion during exercise accounted for 29% of the variance in exercise performance improvement [43]. In the present investigation, exercise performance was not

Table 2 Ratings of main side effects in the 24 h after the ingestion of caffeine or a placebo

Variable (units)	Placebo	Caffeine	Effect size (95%CI)	Qualitative inference	<i>P</i> value
Nervousness (a.u.)	1.3 ± 1.2	3.7 ± 2.4	2.1 (1.2/2.9)	Most likely	0.01
Vigour (a.u.)	1.6 ± 1.8	4.7 ± 2.9	1.8 (0.8/2.8)	Very likely	0.04
Irritability (a.u.)	1.2 ± 0.6	1.5 ± 1.5	0.2 (− 0.8/1.2)	Unclear	0.73
Muscle pain (a.u.)	1.6 ± 1.5	1.4 ± 1.4	− 0.1 (− 0.8/0.5)	Unclear	0.79
Headache (a.u.)	2.1 ± 2.2	1.6 ± 2	− 0.2 (− 0.9/0.5)	Unclear	0.66
Gastrointestinal distress (a.u.)	1.1 ± 0.6	2.2 ± 2.0	1.2 (0.2/2.3)	Likely	0.12
Diuresis (a.u.)	1.2 ± 0.6	2.4 ± 2.1	1.2 (0.0/2.3)	Likely	0.16
Insomnia (a.u.)	1.1 ± 0.4	2.8 ± 2.7	1.8 (0.1/3.5)	Likely	0.11

Data is shown as mean ± SD for 12 healthy participants. Each side effect was self-reported by using 1–10 arbitrary units (a.u.) scale

CI confidence interval

investigated as exercise intensity and duration were kept constant in both experimental trials. However, the reduced exertion found after the ingestion of caffeine despite maintaining the same exercise intensity might have also helped to enhance fat oxidation during exercise as participants reported that they felt the workload lighter with caffeine than with the placebo. Overall, the ingestion of caffeine before an exercise trial of submaximal exercise induces the release of neurotransmitters and catecholamines that may (1) produce a higher bioavailability of fatty acids and (2) lower exertion that may ultimately result in a higher reliance on fat as an energy source for muscles in contraction.

The acute ingestion of caffeine was accompanied by several pre-exercise and post-exercise adverse effects. Before exercise, caffeine increased systolic and diastolic pressure. Although the caffeine-induced change in blood pressure had little clinical impact on this sample of healthy and active individuals, this might be a negative effect for those with elevated blood pressures seeking to improve fat oxidation with caffeine. Interestingly, the daily intake of 3 mg/kg of caffeine produces that the caffeine-induced effect on blood pressure disappeared after 8 days of continuous ingestion [44], suggesting that there is tolerance to the cardiovascular effect of caffeine at rest. After exercise, caffeine increased self-reported ratings of nervousness and vigour. There were also self-reported drawbacks such as gastrointestinal distress, diuresis, and insomnia. These side effects have been found in similar cases of athletes seeking to enhance physical performance by ingesting the same dosage of caffeine [34, 35, 45]. Contrary to the effect of caffeine on blood pressure, caffeine's side effects such as increased nervousness and vigour, irritability, insomnia, and diuresis increased with chronic ingestion (i.e., up to 20 days; [44]). In light of these results, caffeine should only be recommended for individuals seeking to augment fat oxidation during exercise and who do not have any previous history of cardiovascular problems or high caffeine sensitivity. In addition, due to the tolerance to some of the most important ergogenic effects of caffeine

[46] and caffeine's selective efficacy in enhancing fat oxidation at submaximal exercise, caffeine intake should only be recommended for exercise sessions that entail continuous exercise at Fatmax.

There are limitations associated with this investigation that should be considered to improve the results' applicability. First, we did not obtain blood samples nor tissue samples. Thus, we were unable to separate the effect induced by caffeine intake on adipose tissue / intramuscular triacylglycerols oxidation. We are also unable to establish the caffeine's ability to deliver released fatty acids to active skeletal muscle. Second, we only used one dose of caffeine (3 mg/kg) and tested its effect on substrate oxidation at one exercise intensity (Fatmax). Further investigations should be aimed at determining if there is a dose–response of caffeine on shifting fat oxidation. It is also necessary to determine the effect of acute caffeine intake on intensities below Fatmax. Finally, we used a sample of both men and women with low habituation to caffeine. An analysis of the subsamples of men and women participants confirmed that the effect of caffeine to shifting substrate oxidation was present in both groups. However, future investigation should determine whether the effect of acute caffeine intake to enhance fat oxidation during exercise of submaximal intensity is similar in both sexes and the time course of tolerance to the benefit of caffeine in enhancing fat oxidation during exercise.

In summary, the acute ingestion of caffeine enhanced fat oxidation during 1 h of cycling at Fatmax at the expense of reduced carbohydrate oxidation. The effect of caffeine on fat oxidation was present during the entire trial and produced a meaningful increment of 27.0% in the amount of fat oxidized during the trial. Caffeine produced a slightly higher blood pressure before exercise and a higher rating of several minor side effects after exercise. Although the clinical relevance of these drawbacks was inconsequential in the sample of healthy individuals employed in this investigation, the occurrence of these side effects should be taken into account when using this stimulant to reduce body fat in populations

with hypertension or high sensitivity to caffeine. Lastly, it is likely that the effect of caffeine on fat oxidation is only present when the intensity of exercise is close to or below Fatmax. This is because higher exercise intensities might dampen caffeine's efficacy to shift substrate oxidation since cellular mechanisms can favour the use of carbohydrates instead of fat.

Acknowledgements The authors wish to thank the subjects for their invaluable contribution to the study.

Funding This investigation did not receive any funding.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; and no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

References

- Goldstein ER, Ziegenfuss T, Kalman D et al (2010) International society of sports nutrition position stand: Caffeine and performance. *J Int Soc Sports Nutr* 7:5
- Salinero J, Lara B, Del Coso J (2019) Effects of acute ingestion of caffeine on team sports performance: a systematic review and meta-analysis. *Res Sport Med* 27:238–256. <https://doi.org/10.1080/15438627.2018.1552146>
- Grgic J, Grgic I, Pickering C et al (2019) Wake up and smell the coffee: Caffeine supplementation and exercise performance - An umbrella review of 21 published meta-analyses. *Br J Sports Med* 54:681–688. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-100278>
- Maughan RJ, Burke LM, Dvorak J et al (2018) IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *Br J Sports Med* 52:439–455. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099027>
- Fredholm BB, Yang J, Wang Y (2017) Low, but not high, dose caffeine is a readily available probe for adenosine actions. *Mol Aspects Med* 55:20–25
- Graham TE (2001) Caffeine and exercise metabolism, endurance and performance. *Sport Med* 31:785–807
- Davis JK, Green JM (2009) Caffeine and anaerobic performance: Ergogenic value and mechanisms of action. *Sport Med* 39:813–832
- Ruiz-Moreno C, Lara B, Brito de Souza D et al (2020) Acute caffeine intake increases muscle oxygen saturation during a maximal incremental exercise test. *Br J Clin Pharmacol* 86:861–867. <https://doi.org/10.1111/bcp.14189>
- Gutiérrez-Hellín J, Del Coso J (2018) Effects of p-Synephrine and caffeine ingestion on substrate oxidation during exercise. *Med Sci Sport Exerc* 50:1899–1906. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001653>
- Costill DL, Dalsky GP, Fink WJ (1978) Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance. *Med Sci Sports* 10:155–158
- Venables MC, Achten J, Jeukendrup AE (2005) Determinants of fat oxidation during exercise in healthy men and women: A cross-sectional study. *J Appl Physiol*. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.0100662.2003>
- Graham TE, Helge JW, MacLean DA et al (2000) Caffeine ingestion does not alter carbohydrate or fat metabolism in human skeletal muscle during exercise. *J Physiol* 529:837–847. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00837.x>
- Graham TE, Battram DS, Dela F et al (2008) Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise? *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* 33:1311–1318. <https://doi.org/10.1139/H08-129>
- Graham TE, Spriet LL (1995) Metabolic, catecholamine, and exercise performance responses to various doses of caffeine. *J Appl Physiol* 78:867–874. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.1995.78.3.867>
- Beaumont RE, James LJ (2017) Effect of a moderate caffeine dose on endurance cycle performance and thermoregulation during prolonged exercise in the heat. *J Sci Med Sport* 20:1024–1028. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2017.03.017>
- Hodgson AB, Randell RK, Jeukendrup AE (2013) The metabolic and performance effects of caffeine compared to coffee during endurance exercise. *PLoS ONE* 8:e59561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059561>
- Anderson DE, Hickey MS (1994) Effects of caffeine on the metabolic and catecholamine responses to exercise in 5 and 28 degrees C. *Med Sci Sports Exerc* 26:453–458
- Ryu S, Choi SK, Joung SS et al (2001) Caffeine as a lipolytic food component increases endurance performance in rats and athletes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47:139–146. <https://doi.org/10.3177/jnsv.47.139>
- Donnelly K, McNaughton L (1992) The effects of two levels of caffeine ingestion on excess postexercise oxygen consumption in untrained women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 65:459–463. <https://doi.org/10.1007/BF00243514>
- Schubert MM, Sabapathy S, Leveritt M, Desbrow B (2014) Acute exercise and hormones related to appetite regulation: a meta-analysis. *Sports Med* 44:387–403. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0120-3>
- Alkhatib A, Seijo M, Larumbe E, Naclerio F (2015) Acute effectiveness of a “fat-loss” product on substrate utilization, perception of hunger, mood state and rate of perceived exertion at rest and during exercise. *J Int Soc Sports Nutr* 12:44. <https://doi.org/10.1186/s12970-015-0105-8>
- Cruz R, de Aguiar R, Turnes T et al (2015) Caffeine affects time to exhaustion and substrate oxidation during cycling at maximal lactate steady state. *Nutrients* 7:5254–5264. <https://doi.org/10.3390/nu7075219>
- Maunder E, Plews DJ, Kilding AE (2018) Contextualising maximal fat oxidation during exercise: Determinants and normative values. *Front Physiol* 23:599. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00599>
- Gutiérrez-Hellín J, Ruiz-Moreno C, Del Coso J (2019) Acute p-synephrine ingestion increases whole-body fat oxidation during 1-h of cycling at Fatmax. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02101-6>
- Filip A, Wilk M, Krzysztofik M, Del Coso J (2020) Inconsistency in the ergogenic effect of caffeine in athletes who regularly consume caffeine: Is it due to the disparity in the criteria that defines habitual caffeine intake? *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu12041087>
- Frandsen J, Pistoljevic N, Quesada JP et al (2020) Menstrual cycle phase does not affect whole body peak fat oxidation rate during a graded exercise test. *J Appl Physiol* 128:681–687. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00774.2019>
- Horton TJ, Miller EK, Glueck D, Tench K (2002) No effect of menstrual cycle phase on glucose kinetics and fuel oxidation during moderate-intensity exercise. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00238.2001>
- Lara B, Gutiérrez-Hellín J, García-Bataller A et al (2019) Ergogenic effects of caffeine on peak aerobic cycling power during the

- menstrual cycle. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02100-7>
29. Lara B, Gutiérrez Hellín J, Ruíz-Moreno C et al (2019) Acute caffeine intake increases performance in the 15-s Wingate test during the menstrual cycle. *Br J Clin Pharmacol*. <https://doi.org/10.1111/bcp.14175>
 30. Burke LM, Hawley JA, Wong SHS, Jeukendrup AE (2011) Carbohydrates for training and competition. *J Sports Sci* 29:S17–S27. <https://doi.org/10.1080/02640414.2011.585473>
 31. Sawka MN, Burke LM, Eichner ER et al (2007) Exercise and fluid replacement. *Med Sci Sports Exerc* 39:377–390
 32. Brouwer E (1957) On simple formulae for calculating the heat expenditure and the quantities of carbohydrate and fat oxidized in metabolism of men and animals, from gaseous exchange (Oxygen intake and carbonic acid output) and urine-N. *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 6:795–802
 33. Borg GAV (1954) Psychophysical bases of perceived exertion. *Plast Reconstr Surg* 14:377–381. <https://doi.org/10.1249/00005768-198205000-00012>
 34. Salinero JJ, Lara B, Abian-Vicen J et al (2014) The use of energy drinks in sport: Perceived ergogenicity and side effects in male and female athletes. *Br J Nutr* 112:1494–1502. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002189>
 35. Lara B, Ruiz-Vicente D, Areces F et al (2015) Acute consumption of a caffeinated energy drink enhances aspects of performance in sprint swimmers. *Br J Nutr* 114:908–914. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002573>
 36. Hopkins WG, Marshall SW, Batterham AM, Hanin J (2009) Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Med Sci Sports Exerc* 41:3–13. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31818cb278>
 37. Hopkins WG (2020) A Spreadsheet for deriving a confidence interval, mechanistic inference and clinical inference from a *p* value. <https://www.sportsci.org/2007/wghinf.htm>. Accessed 20 Jun 2020
 38. McCall AL, Millington WR, Wurtman RJ (1982) Blood-brain barrier transport of caffeine: Dose-related restriction of adenine transport. *Life Sci* 31:2709–2715. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(82\)90715-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90715-9)
 39. Purdom T, Kravitz L, Dokladny K, Mermier C (2018) Understanding the factors that effect maximal fat oxidation. *J Int Soc Sports Nutr* 15:3. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0207-1>
 40. Randell RK, Rollo I, Roberts TJ et al (2017) Maximal fat oxidation rates in an athletic population. *Med Sci Sports Exerc* 49:133–140. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001084>
 41. Daly J, Shi D (1994) The role of adenosine receptors in the central action of caffeine. *Pharmacopsychocologia* 7:201–213. <https://doi.org/10.1201/9781439822470.ch1>
 42. Killen LG, Green JM, O’Neal EK et al (2013) Effects of caffeine on session ratings of perceived exertion. *Eur J Appl Physiol* 113:721–727. <https://doi.org/10.1007/s00421-012-2480-z>
 43. Doherty M, Smith PM (2005) Effects of caffeine ingestion on rating of perceived exertion during and after exercise: a meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports* 15:69–78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2005.00445.x>
 44. Ruiz-Moreno C, Lara B, Salinero JJ et al (2020) Time course of tolerance to adverse effects associated with the ingestion of a moderate dose of caffeine. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02167-2>
 45. Lara B, Gonzalez-Millán C, Salinero JJ et al (2014) Caffeine-containing energy drink improves physical performance in female soccer players. *Amino Acids* 46:1385–1392. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1709-z>
 46. Lara B, Ruiz-Moreno C, Salinero JJ, Del Coso J (2019) Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. *PLoS ONE* 14:e0210275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275>

ANEXO ARTÍCULO 3

Time course of tolerance to the performance
benefits of caffeine.

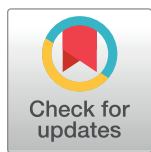
RESEARCH ARTICLE

Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine

Beatriz Lara, Carlos Ruiz-Moreno, Juan José Salinero , Juan Del Coso *

Camilo José Cela University, Exercise Physiology Laboratory, Madrid, Spain

* jdelcoso@ucjc.edu



Abstract

The ergogenic effect of acute caffeine ingestion has been widely investigated; however, scientific information regarding tolerance to the performance benefits of caffeine, when ingested on a day-to-day basis, is scarce. The aim of this investigation was to determine the time course of tolerance to the ergogenic effects of a moderate dose of caffeine. Eleven healthy active participants took part in a cross-over, double-blind, placebo-controlled experiment. In one treatment, they ingested 3 mg/kg/day of caffeine for 20 consecutive days while in another they ingested a placebo for 20 days. Each substance was administered daily in an opaque unidentifiable capsule, and the experimental trials started 45 min after capsule ingestion. Two days before, and three times per week during each 20-day treatment, aerobic peak power was measured with an incremental test to volitional fatigue (25 W/min) and aerobic peak power was measured with an adapted version of the Wingate test (15 s). In comparison to the placebo, the ingestion of caffeine increased peak cycling power in the incremental exercise test by $\sim 4.0 \pm 1.3\%$ for the first 15 days ($P < 0.05$) but then this ergogenic effect lessened. Caffeine also increased peak cycling power during the Wingate test on days 1, 4, 15, and 18 of ingestion by $\sim 4.9 \pm 0.9\%$ ($P < 0.05$). In both tests, the magnitude of the ergogenic effect of caffeine vs. placebo was higher on the first day of ingestion and then progressively decreased. These results show a continued ergogenic effect with the daily ingestion of caffeine for 15–18 days; however, the changes in the magnitude of this effect suggest progressive tolerance.

OPEN ACCESS

Citation: Lara B, Ruiz-Moreno C, Salinero JJ, Del Coso J (2019) Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. PLoS ONE 14(1): e0210275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275>

Editor: Øyvind Sandbakk, Norwegian University of Science and Technology, NORWAY

Received: July 17, 2018

Accepted: December 19, 2018

Published: January 23, 2019

Copyright: © 2019 Lara et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files. Researchers might also contact the Exercise Physiology Laboratory of the Camilo Jose Cela University at jdelcoso@ucjc.edu for any additional query regarding the data of this investigation.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The ergogenic effects of acute ingestion of caffeine (3–9 mg/kg) have been well contrasted in a variety of exercise situations in original investigations and subsequent meta-analyses [1–4], although other factors such as sex, timing and form of caffeine administration need further research [5]. There is also a growing consensus about the main mechanism behind caffeine ergogenicity during locomotor activities, with much evidence in animal [6, 7] and human models [8] supporting the ability of caffeine to act as an adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonist. Although other mechanisms, such as fatty acid mobilization and oxidation, potassium ion attenuation in the interstitium and calcium iron release from the sarcoplasmic reticulum

have also been proposed [2, 9], the inhibition of the negative effects that adenosine induces on neurotransmission, arousal and pain perception has been proposed as the main mechanism behind the effectiveness of caffeine to increase performance in endurance- and power-based exercises [10, 11]. However, there is controversy about the presence of progressive tolerance to its ergogenic effects when ingested on a day-to-day basis.

It is a common phenomenon that tissues respond to hormonal overstimulation with a decrease in the number of pertinent receptors and to hormonal understimulation with an increase in the number of pertinent receptors [12]. According to this notion, Fredholm [13] found an increase in the number of binding sites for adenosine in the brain cortex of rats treated for two weeks with 10 mg/kg/day of caffeine. This mechanism suggests that the daily intake of caffeine would result in more newly created adenosine receptors, reducing in part the blocking-action of caffeine and thus, its ergogenicity during exercise (e.g., habituation).

Based on these investigations with animals, a progressive habituation to the performance benefits of caffeine has been proposed in humans when it is consumed chronically [14]. Previous investigations have focused on determining the changes in the performance benefits obtained with caffeine when it is consumed on a daily basis over long periods of time [15–20], but the experiments on this topic have used very diverse approaches. Several studies have used cross-sectional research protocols by comparing the improvements in performance of acute ingestion of caffeine in naïve/low caffeine consumers vs. individuals with habitual caffeine intake [15–17]. The outcomes of this type of research protocols are inconsistent because naïve/low caffeine consumers benefited from the acute intake of 3-to-6 mg/kg of caffeine to a similar extent compared to habitual caffeine consumers [15, 16] while a higher ergogenic effect in non-habitual caffeine consumers vs. habitual consumers has also been reported with 5 mg/kg of acute caffeine intake [17]. It is possible that the testing of individuals with different degrees of habituation to caffeine (e.g., low, moderate and high caffeine consumers), the use of diverse thresholds to consider naïve/low caffeine consumers (25 and 50 mg/day) and the different exercise protocols (time trial and time-to-exhaustion tests) have made it impossible to reach definitive conclusions regarding caffeine tolerance on exercise performance, as has been recently debated [16, 21].

Other studies have used longitudinal research protocols to determine the presence of tolerance to caffeine ergogenicity. Some investigations have tested the changes in the ergogenic effects obtained with acute caffeine intake (3-to-6 mg/kg) after 2–4 days of caffeine withdrawal in habitual caffeine consumers [18, 19]. These investigations have found that acute caffeine intake was equally effective before and after the caffeine withdrawal period. Thus, according to these investigations [18, 19], the absence of effects on exercise performance produced by the cessation in the intake of caffeine might be related to the lack of habituation to caffeine, although withdrawal and habituation to caffeine might follow a different time course. Stadheim et al. [22] found that caffeine ingestion of either 3 or 4.5 mg/kg increased exercise performance when it is administered over two consecutive days. Beaumont et al. [20] administered caffeine (1.5-to-3 mg/kg/day) to a group of low caffeine consumers for 28 consecutive days and they were compared to individuals that received a placebo for the same period. They found that individuals in the caffeine treatment group demonstrated a lower ergogenic effect from acute caffeine supplementation after the 28-day treatment, measured with a 30-min timed performance task, while the individuals in the control group still responded to caffeine intake after the treatment (3 mg/kg). This investigation represented the first research protocol that used consistent caffeine administration to induce a standardized caffeine habituation among individuals, but the lack of a post-supplementation comparison between caffeine and placebo trials does not allow distinguishing between the effects of tolerance and the training effects during the 28-day treatment. Lastly, with the current evidence it is impossible to

determine when tolerance to the ergogenic effects of caffeine appears, but the combined data of previous investigations [20, 22] suggest that habituation to the ergogenic effect of caffeine might occur when it is ingested over 2 to 28 consecutive days.

Thus, although there is a paradigm suggesting that habitual caffeine intake may influence the performance benefits derived from acute caffeine ingestion, the scientific literature does not support this notion. The aim of the current investigation was to determine the existence and time course of tolerance to the ergogenic effects of caffeine using a longitudinal research protocol in which participants received a 20-day treatment of caffeine and placebo, to control for between-subject variability and progressive training adaptations. We hypothesized that caffeine ergogenicity would be progressively reduced when this substance is consumed day-to-day in a moderate dose (3 mg/kg/day) for 20 consecutive days but that it would still be ergogenic after a short habituation protocol.

Materials and methods

Ethical statement

One week before the onset of the study, the participants were fully informed of the experimental procedures and the risks and discomforts associated with the research and gave their informed written consent to participate in the investigation. The study was approved by the Camilo José Cela Research Ethics Committee and has been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

Participants

Eleven healthy active (>4 days of training per week; > 45 min per day) individuals volunteered to participate in this investigation. They had a mean \pm standard deviation (SD) age of 32.3 ± 4.9 yrs., height of 171 ± 8 cm, body mass of 66.6 ± 13.6 kg, body fat of $16.6 \pm 5.0\%$ and maximal oxygen uptake (VO_2max) of 48.0 ± 3.8 mL/kg/min. There were three women in the sample who always started the treatments at the beginning of the luteal phase. Because the duration of the caffeine/placebo treatments was longer than the luteal phase of the female participants, the last days of each treatment occurred in the follicular phase. A previous investigation indicated that the pharmacokinetics of caffeine is similar in all phases of the menstrual cycle [23] and thus, it is unlikely that the change from luteal to follicular phase within the same treatment had any effect on the outcomes of this investigation. All the participants were light caffeine consumers (< 50 mg of caffeine per day), were non-smokers, who had had no previous history of cardiopulmonary diseases or musculoskeletal injuries in the previous three months. All this information was obtained from a pre-participation screening that included a medical and training history and a food frequency questionnaire. The participants were also encouraged to avoid medications or nutritional supplements for the duration of the study.

Experimental design

A double-blind, placebo-controlled, randomized and cross-over experimental design was used in this study. Each participant took part in 2 identical protocols and thus acted as their own control: in one protocol, participants ingested an unidentifiable capsule containing 3 mg of caffeine per kg of body mass each day of the protocol (3 mg/kg/day; 100% purity, Bulk Powders, United Kingdom) for 20 consecutive days; in another protocol, they ingested the same capsule but filled with a placebo (e.g., cellulose; 100% purity, Guinama, Spain) for 20 consecutive days. The capsules were ingested daily at 9.00 am with 250 mL of tap water and in a fasted

state (at least, 8 h after their last meal). Two days before the onset of each protocol of ingestion (day 0), and three times per week (i.e., day 1, 4, 6, 8, 13, 15, 18 and 20) within each treatment, participants performed the same exercise protocol composed of a maximal graded exercise test on a cycle ergometer to volitional fatigue and an adapted version of the Wingate test (all-out 15 s sprint). On day 0 of each treatment, no capsule was ingested before exercise while, on all but one of the remaining days, the exercise performance measurement always started 45 min after the ingestion of the assigned capsule (Fig 1). The experimental procedures on day 11 were different from the remaining days of measurement: on this day, the graded exercise test and the 15-s Wingate test were performed before -not after- capsule intake with the intention of having a “control” situation in the mid-point of the treatments to determine whether caffeine was still ergogenic at that time. Nevertheless, the capsule with caffeine/placebo was ingested on day 11 after the performance measurements to achieve 20 days of consecutive treatment (Fig 1). We chose to evaluate performance variables three times per week to have enough sensitivity to accurately detect habituation to the ergogenic effects of caffeine. The order of the 20-day ingestion protocols was randomized and they were separated by 7 days to allow for complete recovery and caffeine wash-out. Compliance with the treatments was verbally examined on a daily basis throughout the entire experiment and no incidences were reported during the whole experiment.

Standardizations

For the month before the onset of the experiment, participants refrained from all sources of dietary caffeine in order to eliminate any habituation to caffeine. Consumption of dietary caffeine (coffee, tea, chocolate, sodas, energy drinks, etc) and other stimulants also ceased for the duration of the experiment and compliance was verified with dietary recalls. Participants were also encouraged to maintain their training routines and to keep a stable fitness state during the experiment. One week before the first ingestion protocol, participants underwent a routine medical screening to ensure that they were in good health and suitable for the experiment. Participants were familiarized twice with all the experimental protocols and body mass was measured (± 50 g, Radwag, Poland) to calculate caffeine dosage. Environmental temperature and

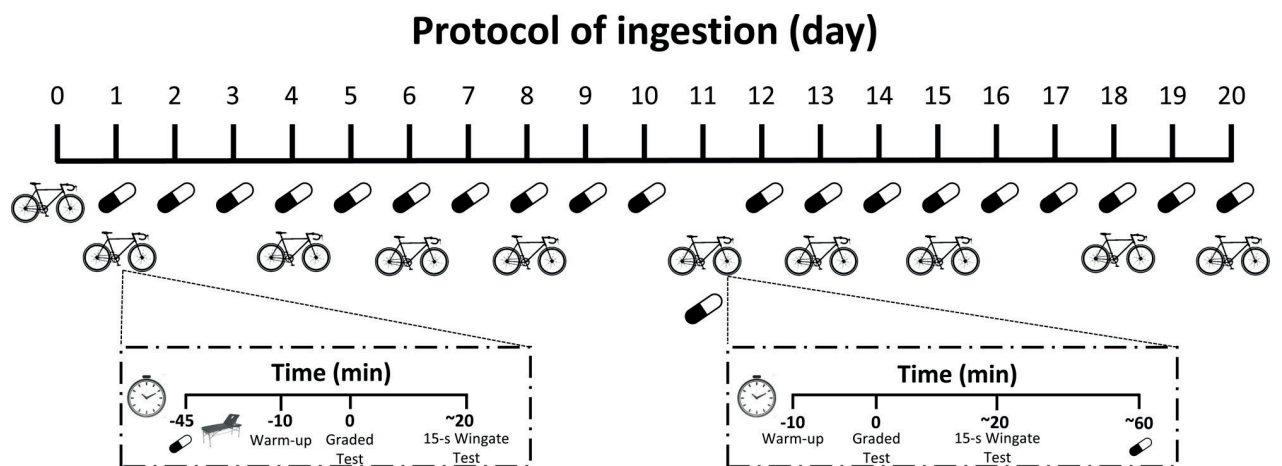


Fig 1. Experimental design of the investigation. Caffeine (3 mg/kg/day) or a placebo was administered for 20 consecutive days in a randomized order. Exercise performance was measured on day 0 (48 h before treatment) and on days 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18 and 20 with each protocol. Exercise performance assessment included a graded exercise test on a cycle ergometer to volitional fatigue and the 15-s Wingate test 45 min after the ingestion of the assigned capsule. Only on day 11 during each treatment, participants ingested the capsule after the end of the exercise.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275.g001>

humidity were kept constant in all experimental trials ($21.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$ air temperature and $30 \pm 10\%$ relative humidity). Standardized encouragement and feedback were given to the participants in all trials by the same researcher who was blinded to the treatments. The seat and handlebar positions on the cycle ergometer were obtained in the familiarization trials and replicated for each individual in all trials.

Experimental trials

On day 0, participants arrived at the laboratory at 8.00 and body fat percentage was measured by bioelectrical impedance (B-418, Tanita, Japan). Participants then dressed in a T-shirt, and shorts and a heart rate belt (Wearlink, Polar, Finland) was attached to their chest. After that, they rested supine for 45 min. Resting heart rate and systolic and diastolic blood pressure (M6 Comfort, Omron, Japan; by triplicate) were measured during the last 5 min of the resting period.

After the resting measurements, participants performed a 10-min standardized warm-up on a cycle ergometer (SNT Medical, Cardgirus, Spain) at 50 W and then exercise intensity was progressively increased by 25 W/min (stepwise increases) until volitional fatigue. Pedaling frequency was individually-chosen (between 75 and 90 rpm) but maintained during the whole graded exercise test and replicated in all experimental trials. During the test, oxygen uptake (VO_2) was continuously measured by means of a breath-by-breath analyzer (Metalyzer 3B, Cortex, Germany) and the data were averaged every 15 s. In this graded exercise test, the wattage attained at exhaustion (W_{max} ; aerobic peak power) and the $\text{VO}_{2\text{max}}$ were determined. W_{max} was recorded as the exercise load on the cycle ergometer at the moment that participants abruptly stopped pedaling or when an individual's pedaling frequency was lower than 50 rpm. $\text{VO}_{2\text{max}}$ was defined as the highest VO_2 value obtained during the test. The $\text{VO}_{2\text{max}}$ was considered valid when participants rated their perceived exertion higher than 19 on the Borg scale, the VO_2 difference between the last two consecutive workloads was less than $0.10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, respiratory exchange ratio was higher than 1.10, heart rate was higher than 80% of the age-adjusted estimate of maximal heart rate and lactate concentration was more than 7 mmol/L [24]. Certified calibration gases (16.0% O_2 ; 5.0% CO_2 , Cortex, Germany) and a 3-L syringe were used to calibrate the gas analyzer and the flow meter before each trial. One minute after the end of the graded test, a blood sample was obtained from a fingertip to analyze blood lactate concentration (Lactate Pro 2, Arkay, Japan).

After the maximal graded exercise test, participants continued pedaling at 50 W for 7 min. After this, they performed a 15-s Wingate test on the same cycle ergometer (SNT Medical, Cardgirus, Spain) and with a load that represented 7.5% of body mass, as previously described [25]. For this test, participants started from a stationary position with their dominant leg ready to pedal and they were told that "they had to pedal as fast as they could from the beginning and for the whole duration of the test". After the "start" command, the resistance load was progressively applied within 3 s to produce an acceleration phase, as previously suggested [26]. The researcher verified that participants remained seated during the whole test. During the Wingate test, cycling power was obtained with a frequency of 1 Hz and the peak and mean cycling power obtained during the test were recorded. One minute after the end of the test, blood lactate concentration was measured as previously described.

Participants were asked about their self-perceived endurance and exertion just after the graded exercise test and about their self-perception of muscle power just after the 15-s Wingate test. This questionnaire included a 1–10 point scale to assess each item, and participants were previously informed that 1 point meant a minimal amount of that item and 10 points meant a maximal amount of the item. The questionnaire has been previously used to assess perceived ergogenicity after the intake of caffeine [27].

The protocol described above for day 0 was replicated for each day of measurement during the 20-day treatment (e.g., days 1, 4, 6, 8, 13, 15, 18 and 20) but with the administration of caffeine or placebo 45 min before the onset of the performance tests. On day 11, participants ingested the assigned capsule after the end of the exercise testing (Fig 1) to produce a continuous 20-day ingestion protocol. Seven days after the conclusion of the first protocol of ingestion (placebo or caffeine), the remaining protocol of ingestion was carried out mimicking the procedures described above.

Statistical analysis

Data were collected as previously indicated and the results of each test were subsequently blindly introduced into the statistical package SPSS v 20.0 for later analysis. Normality was tested for each variable with the Shapiro-Wilk test. All the variables included in this investigation presented a normal distribution ($P > 0.05$) and parametric statistics were used to determine the ergogenicity of caffeine. Differences between the caffeine vs. placebo protocols were determined by two-way analysis of variance (substance \times day of ingestion) with repeated measures. After a significant F test (Geisser-Greenhouse correction for the assumption of sphericity), differences between means were identified using Tukey's HSD *post hoc*. The significance level was set at $P < 0.05$.

The effect size was also calculated in all pairwise comparisons to allow a magnitude-based inference approach [28]. Specifically, the effect-size statistic \pm 90% confidence intervals (CI) was used on log transformed data to reduce bias due to non-uniformity of error. The smallest significant standardized effect threshold was set as 0.2, and a qualitative descriptor was included to represent the likelihood of exceeding this threshold. Ranges of likelihood $<1\%$ indicated almost certainly no chances of change; 1% to 5%, very unlikely; 5% to 25%, unlikely; 25% to 75%, possible; 75% to 95%, likely; 95% to 99%, very likely; $>99\%$, most likely. Differences were rated as unclear when likelihood exceeded $>5\%$ in both positive/negative directions. Effect sizes were interpreted according to the following ranges: <0.2 , trivial; 0.2–0.6, small; 0.6–1.2, moderate; 1.2–2.0, large; 2.0–4.0, very large and; >4.0 , extremely large [28].

Results

Incremental exercise testing

The values for W_{max} were very comparable for day 0 in placebo and caffeine ingestion protocols (3.99 ± 0.75 and 3.97 ± 0.75 W/kg, respectively; $P = 0.66$). In comparison to the placebo, the daily ingestion of caffeine increased W_{max} for the trials performed within the first 18 days of the caffeine protocol (Fig 2, lower panel; $P < 0.05$), except for day 11 when caffeine and placebo were ingested after the testing. Besides, daily caffeine intake also increased W_{max} for the whole treatment with respect to day 0 of the caffeine protocol ($P < 0.05$). In contrast, W_{max} remained constant in the placebo protocol. In the pairwise comparisons, the effect size of caffeine intake on W_{max} was large for day 1 and day 4 and decreased to moderate afterwards (Fig 2, upper panel).

The values for VO_{2max} were very comparable for day 0 in placebo and caffeine ingestion protocols (47.9 ± 8.0 and 46.1 ± 8.4 mL/kg/min; $P = 0.19$). In the day-to-day comparison to the placebo, the ingestion of caffeine increased VO_{2max} on days 1 and 4 (Fig 3, lower panel; $P < 0.05$), and on days 1, 4 and 6 with respect to day 0 of the caffeine protocol ($P < 0.05$). VO_{2max} remained constant in the placebo protocol, except for a reduction on day 1 with respect to day 0 ($P < 0.05$). In the pairwise comparisons, the effect size of caffeine intake on VO_{2max} was very large for day 1, large for day 4 and from moderate to small afterwards (Fig 3, upper panel).

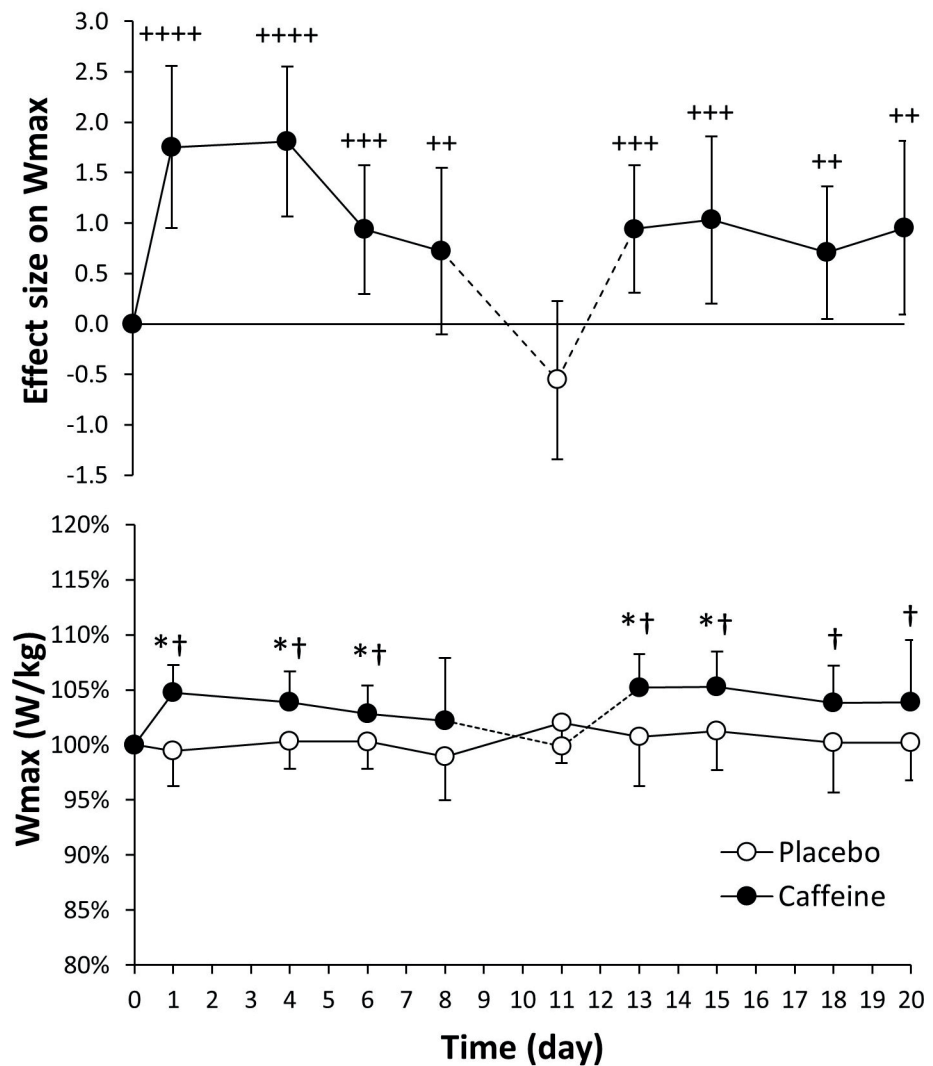


Fig 2. Peak cycling power (W_{max}) obtained during a graded exercise test with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel depicts the effect size (\pm 90% confidence intervals) for all pairwise comparisons. Only effect sizes with a possible likelihood of difference ($>25\%$) are categorized: (+++++) most likely, (++++) very likely, (++) likely, (+) possibly. The lower panel depicts data presented as mean \pm standard deviation. The data have been normalized with respect to the values obtained on day 0 of each treatment to provide a better comparison of the caffeine ergogenic effect in the studied variables. (*) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$. (†) Different from day 0 within the same treatment, $P < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275.g002>

The ingestion of caffeine increased maximal heart rate on day 1 and 8 respect to the placebo (Table 1) but there was no other statistically significant difference between caffeine vs. placebo in the remaining trials. In the pairwise comparisons, the effect size of caffeine intake on maximal heart rate was small for the first 8 days of ingestion and tended to be insignificant afterwards. The ingestion of caffeine increased maximal ventilation on days 1 and 4 respect to the placebo (Table 1) but did not produce any other statistically significant difference for caffeine vs. placebo comparison afterwards. The effect size of caffeine on maximal ventilation was small on days 1 and 4 and was then reduced afterwards.

Blood lactate concentration after the graded exercise test on day 1, and 15 (Table 2; $P < 0.05$) was higher with the ingestion of caffeine in comparison to the placebo and the effect size on

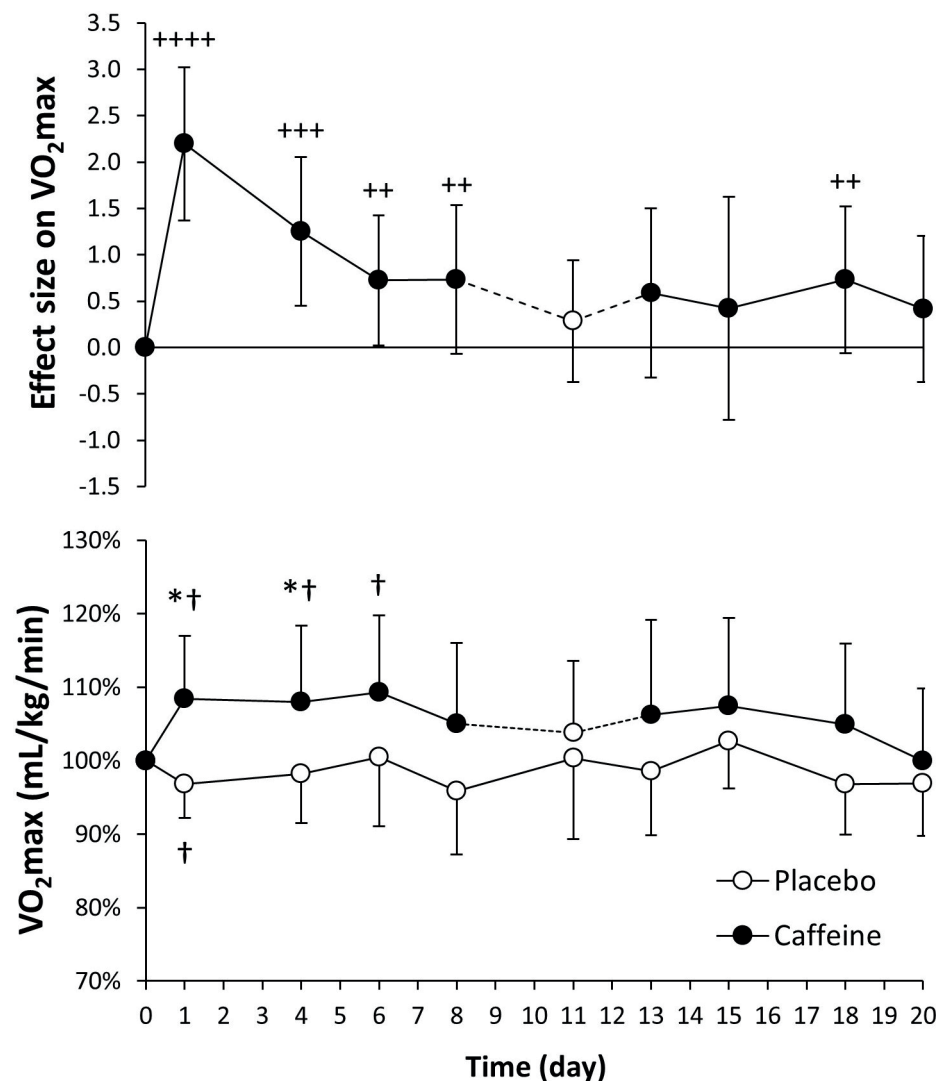


Fig 3. Maximal oxygen uptake (VO₂max) obtained during a graded exercise test with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel depicts the effect size (\pm 90% confidence intervals) for all pairwise comparisons. Only effect sizes with a possible likelihood of difference (>25%) are categorized: (++++) most likely, (+++) very likely, (++) likely, (+) possibly. The lower panel depicts data presented as mean \pm standard deviation. The data have been normalized with respect to the values obtained on day 0 of each treatment to provide a better comparison of the caffeine ergogenic effect in the studied variables. (*) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$. (†) Different from day 0 within the same treatment, $P < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275.g003>

these days was moderate. Participants perceived a higher endurance capacity in the incremental exercise test with caffeine vs. placebo on days 1 and 13 (Table 3; $P < 0.05$) while the size of the caffeine effect was small on these same days. Besides, on days 1, 13, 15 and 18 there was a significant increase in perceived endurance capacity with respect to day 0 of the caffeine protocol ($P < 0.05$). There were no effects of caffeine on perceived exertion after the incremental exercise test, which was always perceived as > 9 points on the 1–10 point scale (Table 3).

15-s Wingate test

The values for the Wingate peak power were very comparable for day 0 in placebo and caffeine ingestion protocols (9.48 ± 0.44 and 9.35 ± 0.54 W/kg; $P = 0.39$). In comparison to the placebo,

Table 1. Maximal heart rate (beats/min) and maximal pulmonary ventilation (L/min) during a maximal graded cycling test with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days.

Day	Maximal heart rate (bpm)				Maximal ventilation (L/min)			
	Placebo	Caffeine	Effect size (±90% CI)	Qualitative inference	Placebo	Caffeine	Effect size (±90% CI)	Qualitative inference
0	177±12	178±13	0.1(-0.2-0.3)	Likely trivial	130±23	136±33	0.2(-0.1-0.50)	Possibly positive
1	175±11	181±12*	0.4(0.1-0.7)	Likely positive	131±26	146 ±36*	0.5(0.1-0.8)	Likely positive
4	176±10	179±8	0.3(0-0.6)	Possibly positive	134±24	148±34*†	0.5(0.2-0.7)	Likely positive
6	178±11	180±11	0.2(-0.2-0.5)	Possibly positive	138±32	142±37	0.1(-0.2-0.4)	Unclear
8	174±10	180±11*	0.5(0.2-0.7)	Likely positive	136±32	141±36	0.1(-0.1-0.4)	Possibly trivial
11	177±9	172±10†	-0.5(-0.9-0)	Likely negative	134±29	133±29	-0.0(-0.2-0.2)	Likely trivial
13	177±10	177±12	0.1(-0.3-0.5)	Unclear	135±26	147±36	0.4(0.1-0.7)	Likely positive
15	175±13	179±8	0.2(-0.2-0.6)	Possibly positive	139±30	150±33†	0.3(0.1-0.6)	Likely positive
18	176±10	177±10	0.1(-0.2-0.4)	Unclear	136±31	143±33	-0.2(-0.1-0.5)	Possibly positive
20	176±10	178±9	0.2(-0.1-0.5)	Possibly positive	136±30	145±28†	0.3(0.1-0.6)	Likely positive

CI = confidence interval;

(*) Caffeine different from placebo for the same day, *P* < 0.05.

(†) Different from day “0” within the same treatment, *P* < 0.05.

Note: On days “0” and “11”, both the placebo and caffeine trials were performed without the administration of any capsule.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275.t001>

the daily intake of caffeine increased Wingate peak power on days 1, 4, 15 and 18 (Fig 4, lower panel; *P* < 0.05). Caffeine also increased Wingate peak power on days 1, 4, 13, 15, 18 and 20 with respect to day 0 of the caffeine protocol (*P* < 0.05). The effect size of caffeine intake on Wingate peak power was large on days 1 and 4 and was reduced to moderate/small afterwards (Fig 4, upper panel). From similar values on day 0 (8.22 ± 0.46 and 8.15 ± 0.43 W/kg; *P* = 0.57) Wingate mean cycling power only increased with caffeine on day 1 of ingestion with respect to the placebo (*P* < 0.05), and on days 1, 15 and 18 with respect to day 0 of the caffeine protocol

Table 2. Blood lactate concentration (mmol/L) after a maximal graded cycling test (VO_{2max}) and after a 15-s Wingate test (Wingate) with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days.

Day	Graded exercise test				15-s Wingate test			
	Placebo	Caffeine	Effect size (±90% CI)	Qualitative inference	Placebo	Caffeine	Effect size (±90% CI)	Qualitative inference
0	13.1±2.8	13.3±2.9	0.1(-0.5-0.6)	Unclear	13.4±3.7	12.9±2.6	-0.0(-0.8-0.7)	Unclear
1	11.8±3.3	14.0±2.8*	0.6(0.1-1.1)	Likely positive	13.3±4.5	14.8±2.5†	0.4(-0.1-0.9)	Possibly positive
4	12.8±2.7	13.6±2.1	-0.1(-0.5-0.4)	Unclear	12.2±3.6	14.5±2.8†	0.6(-0.2-1.6)	Likely positive
6	13.8±3.2	13.8±4.5	0.0(-0.7-0.6)	Unclear	12.3±3.5	14.0±4.5	0.4(-0.2-0.9)	Possibly positive
8	12.7±3.2	13.1±2.4	0.1(-0.5-0.8)	Unclear	12.3±4.3	14.9±4.0	0.5(-0.1-1.1)	Likely positive
11	13.8±2.0	13.5±3.9	-0.4(-1.4-0.6)	Unclear	13.3±3.7	13.0±3.4	0.1(-0.3-0.5)	Unclear
13	12.6±3.8	14.5±3.6	0.6(0.1-1.1)	Likely positive	11.9±2.8	13.9±4.8†	1.1(0.1-2.1)	Likely positive
15	12.3±2.0	14.8±4.0*	0.9(0.0-1.9)	Likely positive	11.8±3.2	14.0±1.8†	1.0(0.4-1.7)	Very likely positive
18	12.9±3.4	15.0±4.8	-0.5(-0.3-1.3)	Unclear	13.8±4.6	13.4±4.2	-0.1(-0.9-0.7)	Unclear
20	13.3±3.5	12.8±3.1	-0.1(-0.8-0.6)	Unclear	14.0±4.4	13.9±2.0	0.1(-0.3-0.6)	Unclear

CI = confidence interval;

(*) Caffeine different from placebo for the same day, *P* < 0.05.

(†) Different from day “0” within the same treatment, *P* < 0.05.

Note: On days “0” and “11”, both the placebo and caffeine trials were performed without the administration of any capsule

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275.t002>

Table 3. Subjective feelings of endurance and exertion (1–10 point scales) after a graded exercise test, and perceived muscle power after a 15-s Wingate test with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days.

Day	Perceived endurance			Qualitative inference	Perceived exertion			Qualitative inference	Perceived muscle power			Qualitative inference
	Placebo	Caffeine	Effect size (±90% CI)		Placebo	Caffeine	Effect size (±90% CI)		Placebo	Caffeine	Effect size (±90% CI)	
0	5.6±1.2	5.4±0.9	-0.1 (-0.6–0.4)	Unclear	9.2±1.0	9.5±0.6	0.3(0–0.6)	Likely positive	5.4±1.0	5.8±0.7	0.4(-0.1–0.9)	Possibly positive
1	5.3±1.5	6.1 ±0.9*†	0.5(0.1–1.0)	Likely positive	9.4±1.1	9.4±0.8	-0.1 (-0.4–0.3)	Unclear	5.7±1.6	6.4±0.7†	0.3(-0.2–0.8)	Possibly positive
4	5.7±1.1	5.9±1.0	0.2(-0.3–0.8)	Unclear	9.4±0.8	9.5±0.7	0.1(-0.5–0.7)	Unclear	6.0±0.7	6.2±1.1	0.0(-0.8–0.9)	Unclear
6	5.9±0.9	5.8±0.9	-0.1 (-0.4–0.3)	Unclear	9.5±0.7	9.6±0.7	0.1(-0.1–0.3)	Unlikely positive	6.3±0.6	5.7±1.3	-1.0 (-2.2–0.2)	Unclear
8	5.3±1.5	5.5±1.8	0.1(-0.5–0.7)	Unclear	9.5±0.8	9.6±0.5	0.1(-0.3–0.5)	Possibly negative	5.0±1.5	5.1±1.7	0.1(-0.5–0.7)	Unclear
11	6.1±1.0	5.0±1.8	-1.3 (-3.0–0.3)	Unclear	9.5±1.0	9.3±1.0	-0.2(-1.0.6)	Unclear	6.3±1.3	5.0±1.7	-1.0 (-2.3–0.2)	Unclear
13	5.5±1.4	6.3 ±0.8†*	0.5(0.1–0.9)	Likely positive	9.7±0.5	9.6±0.7	-0.2 (-1.0–0.6)	Unclear	6.2±1.2	6.2±1.5	-0.1 (-0.9–0.7)	Unclear
15	5.8±1.5	6.2±0.9†	0.2(0.3–0.8)	Unclear	9.6±0.7	9.7±0.5	0.0(-0.6–0.6)	Unclear	5.8±1.2	5.8±1.4	0.0(-0.8–0.8)	Unclear
18	5.8±1.0	6.1±0.9†	0.3(-0.2–0.8)	Possibly positive	9.8±0.4	9.6±0.9	0.0(-0.4–0.3)	Unclear	5.9±1.2	6.1±1.1	0.2(-0.4–0.7)	Unclear
20	5.8±1.2	5.6±1.6	-0.1 (-0.7–0.4)	Unclear	9.8±0.4	9.6±0.9	-0.2(1.5–1.0)	Unclear	5.7±0.0	6.3±0.9	0.6(-0.0–1.2)	Likely positive

Note: All variables were assessed with 1–10 point scales where 1 point meant minimal amount of the variable and 10 points meant maximal amount of that variable (5 points was the value used to indicate not feeling any difference from a regular day). CI = confidence interval;

(*) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$.

(†) Different from day “0” within the same treatment, $P < 0.05$.

Note: On days “0” and “11”, both the placebo and caffeine trials were performed without the administration of any capsule.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275.t003>

(Fig 5, lower panel). The effect size of caffeine intake on Wingate mean power was moderate on days 1 and 4 and decreased to small afterwards (Fig 5, upper panel). Both peak and mean cycling power remained stable in the placebo protocol.

There were no statistically significant differences in blood lactate concentration after the Wingate test in caffeine vs. placebo protocols although caffeine produced a higher blood lactate concentration on days 1, 4, 13 and 15 with respect to day 0 of the caffeine ingestion protocol (Table 2; $P < 0.05$). On these same days, the effect size of caffeine ingestion over the placebo was small-to-moderate. There were no statistically significant differences in perceived muscle power during the Wingate test in caffeine vs. placebo with small effect sizes in pairwise comparisons. However, caffeine produced a higher perceived muscle power on day 1, with respect to day 0 of the caffeine protocol (Table 3; $P < 0.05$).

Discussion

The aim of the study was to determine the existence of tolerance to the ergogenic effects of caffeine using a cross-over, repeated measures longitudinal research protocol that included 20 days of consecutive administration of a moderate dose of caffeine (3 mg/kg) or a placebo. The similar baseline values in all performance variables for the caffeine and placebo protocols, together with the absence of training/familiarization effects within the placebo treatment (as the stable values in all performance variables indicate) present the following main outcomes: a) in comparison to the ingestion of a placebo, for 15 days of consecutive ingestion, caffeine increased peak cycling power obtained during a maximal graded exercise test and VO_{2max} for

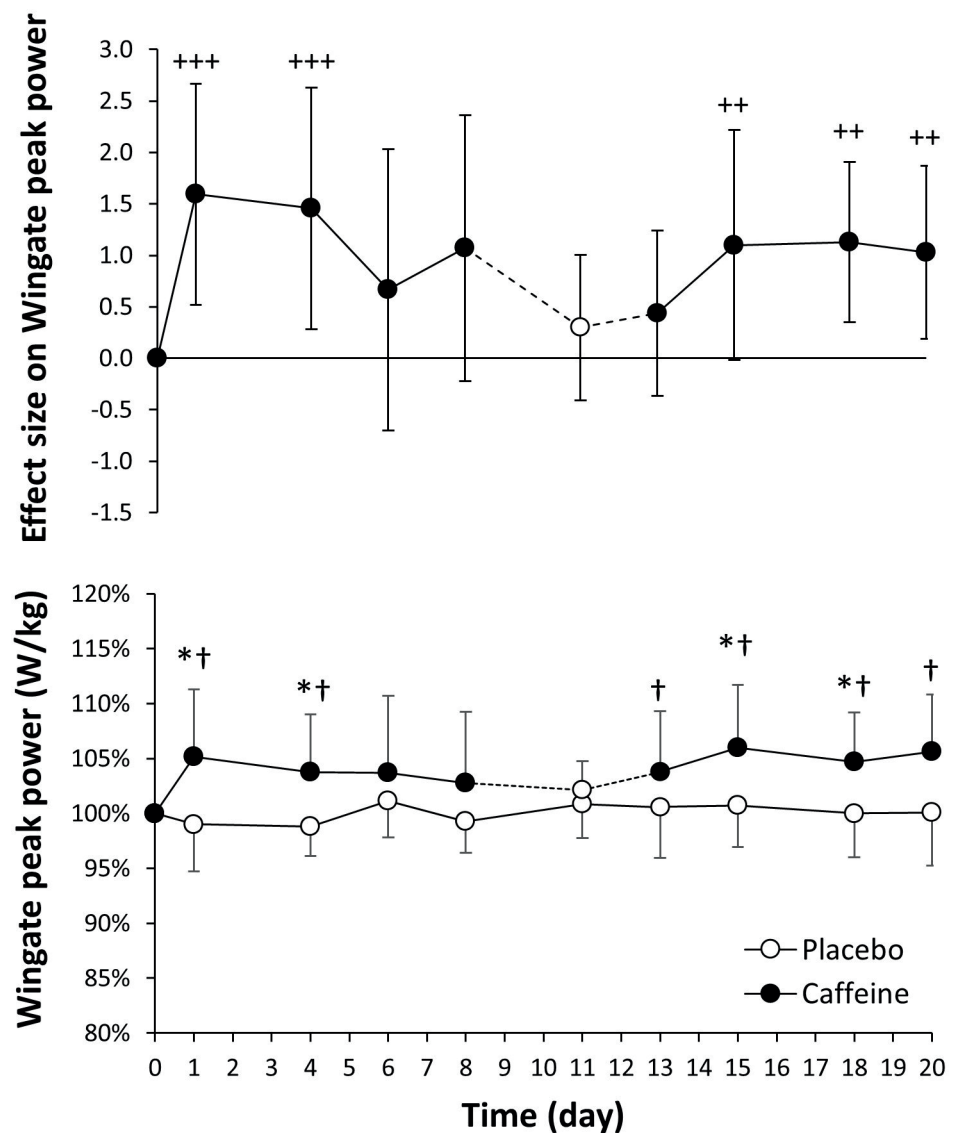


Fig 4. Peak cycling power obtained during an adapted version of the Wingate test (all-out 15 s sprint) with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel depicts the effect size (\pm 90% confidence intervals) for all pairwise comparisons. Only effect sizes with a possible likelihood of difference ($>25\%$) are categorized: (++++) most likely, (+++) very likely, (++) likely, (+) possibly. The lower panel depicts data presented as mean \pm standard deviation. The data have been normalized with respect to the values obtained on day 0 of each treatment to provide a better comparison of the caffeine ergogenic effect in the studied variables. (*) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$. (†) Different from day 0 within the same treatment, $P < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275.g004>

4 days (Figs 2 and 3); b) the ingestion of caffeine also increased for ~18 days of consecutive ingestion the maximal power obtained in a 15-s all-out cycling test, although the ergogenic effect on mean cycling power was only evident after the first day of caffeine ingestion (Fig 4); c) the analysis of the effect sizes derived from the pairwise comparison between the ingestion of 3 mg/kg/day of caffeine vs. placebo revealed that there is a gradual tolerance to the ergogenic effects of caffeine because the size of its ergogenic effect peaked on day 1 of ingestion and decreased afterwards. However, it is necessary to mention that caffeine still exerted small-to-moderate improvements on physical performance after 20 days of consecutive administration

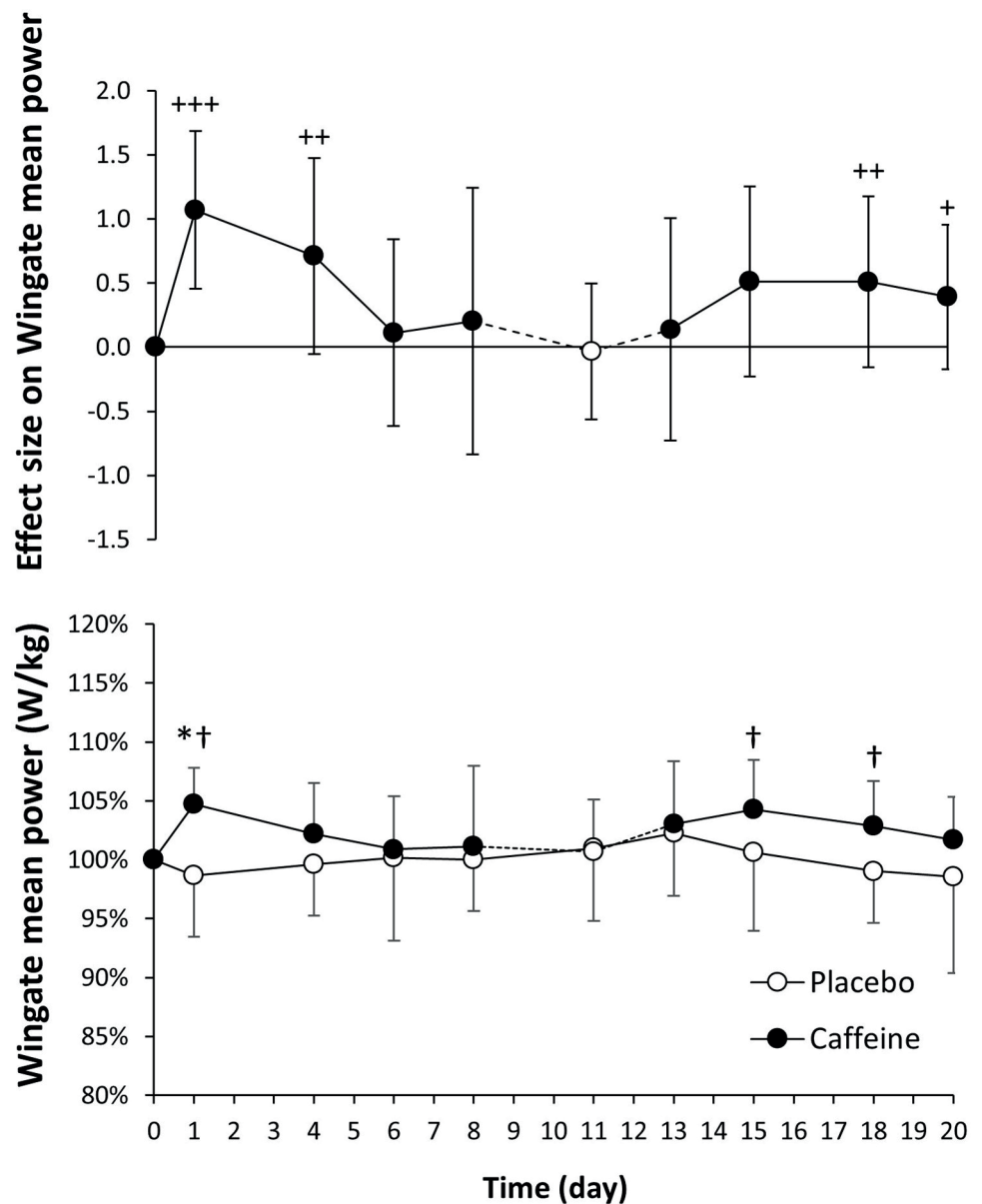


Fig 5. Mean cycling power obtained during an adapted version of the Wingate test (all-out 15 s sprint) with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel depicts the effect size (\pm 90% confidence intervals) for all pairwise comparisons. Only effect sizes with a possible likelihood of difference ($>25\%$) are categorized: (++++) most likely, (+++) very likely, (++) likely, (+) possibly. The lower panel depicts data presented as mean \pm standard deviation. The data have been normalized with respect to the values obtained on day 0 of each treatment to provide a better comparison of the caffeine ergogenic effect in the studied variables. (*) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$. (†) Different from day 0 within the same treatment, $P < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275.g005>

(Figs 2–5). All these results suggest that there is a relative reduction in the ergogenic effects of caffeine when a moderate dose of this substance is ingested daily, but it still has the capacity to improve performance after 20 days of consecutive ingestion.

One of the mechanism that explains the increase in physical performance with acute administration of caffeine is related to its ability to act as an adenosine A_1 and A_{2A} receptor antagonist [6, 7]. Specifically, caffeine is structurally similar to adenosine, a neuromodulator

that might induce central fatigue through reduced neuroexcitability and decreased release of noradrenaline and dopamine, among other neurotransmitters [29]. In this regard, the micromolar tissue concentrations of caffeine resulting from ingestion of low to moderate doses can block A_1 and A_{2A} adenosine receptors [30]. Thus, the intake of caffeine would blunt the fatiguing effects of adenosine through inhibition of the decreased release of the above-mentioned neurotransmitters. This theory is well-supported because it has been found that caffeine infusion (up to 4.3 mg/kg) can block up to 50% of adenosine receptors in the human brain [8]. However, the concept of tolerance/habituation to the ergogenic effects of caffeine has been based on previous research with rodents that reported the capacity of caffeine to block adenosine A_1 and A_{2A} receptors and the upregulation in the number of adenosine receptors in neural and vascular tissues of the brain with the regular consumption of caffeine [31, 32]. More recent investigations have shown that tolerance to caffeine might be driven by alterations in gene expression in striatum while the changes in caffeine metabolism induced after long-term caffeine intake cannot explain development of tolerance to caffeine [33]. All this information suggests that daily caffeine intake results in a higher likelihood of adenosine binding the newly created adenosine receptors, progressively reducing the adenosine-blocking-action of caffeine, coupled with adaptive changes in gene expression that ultimately lead to development of locomotor tolerance to caffeine.

However, the evidence for tolerance to the stimulatory effects of caffeine in humans is inconclusive. In variables of cognitive performance, caffeine administration equally improved performance in habitual and non-consumers of caffeine [34] or even a higher performance benefit was found in high-caffeine consumers than in moderate caffeine consumers [35]. Several investigations indicated that the efficacy of caffeine to improve physical performance may be reduced in individuals who consume moderate to high doses of caffeine daily (130–300 mg/day) in comparison to low caffeine consumers (40–50 mg/day; [17, 36]). Furthermore a progressive tolerance to the ergogenic effects has also been found in individuals that consume 1.5–3.0 mg/kg/day of caffeine for 28 consecutive days [20]. Nevertheless, other investigations have determined that habitual caffeine consumers might also benefit from the ergogenic effects of caffeine even when their self-reported daily caffeine intake surpassed 300 mg/day [15, 16, 18, 37]. It is likely that the differences in the research protocols chosen to study this question, specifically, the use of individuals with different daily intakes and periods of habituation to caffeine, have contributed to the different outcomes. However, previous investigations suggest that caffeine can be ergogenic even after habituation to it.

The experimental design used in the current investigation is innovative, respect to previous research, because the same individuals were tested in two identical treatments with caffeine and a placebo and they acted as their own controls during the whole experiment. All the participants were low caffeine consumers, withdrew from caffeine for one month before the experiment and received the same daily dosage per kg of body mass of caffeine to normalize the protocol for habituation to caffeine. The effects of caffeine intake on performance were measured three times per week to improve accuracy in identifying tolerance to it. Besides, we used a maximal graded exercise test and the Wingate test to broaden the range of the investigation to endurance-like and power-like performance. Finally, in addition to the traditional statistical analysis based on p values, we used a magnitude-inference approach to aid in the identification of tolerance to caffeine. With this experimental design, it was possible to determine a progressive tolerance to the ergogenic effects of caffeine, present in both maximal/peak values of aerobic-based and power-based exercise tests because of the progressive reduction in the effect size of caffeine ergogenicity. However, the results of the current investigation dispute the existence of a complete tolerance to caffeine after 20 days of continuous ingestion because the size of the caffeine ergogenic effect was moderate/small even after this period of consecutive ingestion

(Figs 2–5). In the light of the current results, we can conclude that caffeine benefits physical performance after 20 days of consecutive ingestion although the magnitude of the ergogenic effect is somewhat reduced when compared to the first day of ingestion (i.e., non-habituation to caffeine intake). In the current investigation, the dose of caffeine administered (3 mg/kg/day, equivalent to ~200 mg/day in our participants) was moderate and it was below the daily ingestion reported by habitual caffeine consumers [15, 16, 18, 37]. Thus, it should be investigated whether a higher dose of caffeine intake might change the time course of tolerance to the performance benefits of caffeine.

We want to highlight day 11 of ingestion because participants performed the testing protocols before -instead of after- the ingestion of the assigned capsule, for both caffeine and placebo treatments. This particular variation in the day-to-day protocol of caffeine intake was chosen to assess caffeine tolerance at the mid-point of the treatments but did not interrupt the day-to-day ingestion of the substances. On day 11, caffeine W_{max} and peak power in the Wingate decreased to a similar value to the placebo trial, while these performance variables again increased on day 13 with the administration of caffeine, confirming that it was still effective to increase performance and thus, no tolerance had been produced at this time. In the placebo ingestion protocol, all the performance variables were maintained similar to day 0 during the 20 days of treatment, suggesting a stable fitness level for the duration of this protocol. In contrast, caffeine produced numerous differences not only in the pairwise comparison to the placebo treatment but also to day 0 of the caffeine ingestion protocol. These outcomes reinforce the notion of the maintained ergogenicity of caffeine during a 20-day period together with a progressive reduction in the extent of its ergogenic effect.

After the testing, the participants were asked about their feelings of exertion, endurance and muscle power to determine the perceived ergogenicity of the treatments (Table 3). They perceived high exertion after the graded exercise test on all days of the treatments and in both ingestion protocols, as was expected for this maximal test. They also perceived a significantly higher endurance capacity the first day of caffeine ingestion and after 13 days of ingestion which do not coincide with the increases of caffeine on W_{max} (Fig 2). Similarly, the perception of muscle power was not significantly higher with caffeine in comparison to the placebo on any of the days of treatment, despite caffeine increasing peak cycling power on several occasions (Fig 4). These data indicate that caffeine can be ergogenic when ingested daily for 20 consecutive days even when the participants did not feel they had given an enhanced performance after the ingestion of this stimulant.

The experimental design used in the present investigation had several limitations that should be discussed for a correct application of the results. First, the duration of the chronic caffeine intake lasted for 20 days and it is impossible to determine if greater tolerance to the ergogenic effects of caffeine would occur after 20 days of ingestion. In addition, individuals considered as habitual caffeine consumers can use this substance daily for years and thus, this investigation might not be representative of this chronic consumption [16]. Second, we used laboratory testing with a high reproducibility (between-day coefficient of variation for W_{max} = $2.4 \pm 1.1\%$; for peak cycling power in the 15-s Wingate = $2.6 \pm 0.9\%$) to determine loss of responsiveness to the ergogenic effects of caffeine. However, these results should be confirmed with further research protocols that use field testing or performance assessments in real or simulated sport competition to accurately convey the conclusions of this investigation to athletes in sport situations. Third, tolerance to the ergogenic effects of caffeine was tested with a moderate dose (e.g., 3 mg/kg/day) because we have found that this dose is effective to increase performance in a myriad of laboratory-based tests and sports [38–43]. Nevertheless, it is likely that lower or higher doses of caffeine produce a different time course for tolerance to the ergogenic effect of this substance. Fourth, the obtaining of maximal/peak values in the

performance tests used required high levels of motivation. To maintain motivation in all tests throughout the experiment, a researcher, blinded to the treatments, gave standardized encouragement commands in each trial but it is still possible that the changes in motivation within each treatment affected the outcomes of the investigation. Finally, we did not obtain blood samples during the ingestion protocols to determine plasma caffeine concentration before each experimental trial and thus, we cannot determine whether the changes in caffeine metabolism are in part responsible for the tolerance to the ergogenic effect of caffeine. Despite these limitations, the results of this investigation can shed light on the changes in caffeine ergogenicity when it is consumed daily in a moderate dose.

In summary, the daily intake of caffeine (3 mg/kg/day) significantly increased peak cycling power during a maximal incremental test for the first 15 days of ingestion and improved VO_2max for the first 4 days, when compared to the same treatment with a placebo. Day-to-day pre-exercise caffeine intake also produced higher peak cycling power during the 15-s Wingate tests for ~18 days of intake, although Wingate mean power was only increased on the first day of ingestion with respect to the placebo. After these periods of time, the increases in performance of these variables with caffeine were not statistically different from the placebo. These results suggest the existence of progressive tolerance to the performance benefits of caffeine, particularly because the magnitude of the ergogenic effect of caffeine was higher on the first day of ingestion for both aerobic-based and power-based exercise and decreased afterwards. Nevertheless, the effect size of the caffeine-placebo pairwise comparison remained small-to-moderate after 20 days of consecutive ingestion which suggests that caffeine was still ergogenic after this period of time.

Supporting information

S1 Fig. Individual responses for the percentage of change produced by the ingestion of caffeine over a placebo on peak cycling power (W_{max} ; upper panel) and maximal oxygen uptake (VO_2max ; lower panel) when 3 mg/kg/day of caffeine were administered for 20 consecutive days. Each dot represents the caffeine vs placebo change in each individual and positive values indicate a superior performance with caffeine over placebo. (TIF)

S2 Fig. Individual responses for the percentage of change produced by the ingestion of caffeine over a placebo on Wingate peak (upper panel) and mean cycling power (lower panel) when 3 mg/kg/day of caffeine were administered for 20 consecutive days. Each dot represents the caffeine vs placebo change in each individual and positive values indicate a superior performance with caffeine over placebo. (TIF)

Acknowledgments

The authors wish to thank the subjects for their invaluable contribution to the study.

Author Contributions

Conceptualization: Beatriz Lara, Carlos Ruiz-Moreno, Juan José Salinero, Juan Del Coso.

Formal analysis: Beatriz Lara, Carlos Ruiz-Moreno, Juan José Salinero, Juan Del Coso.

Investigation: Beatriz Lara.

Methodology: Beatriz Lara, Carlos Ruiz-Moreno, Juan Del Coso.

Writing – original draft: Juan Del Coso.

Writing – review & editing: Beatriz Lara, Carlos Ruiz-Moreno, Juan José Salinero.

References

1. Grgic J. Caffeine ingestion enhances Wingate performance: a meta-analysis. *Eur J Sport Sci*. 2017;1–7. Epub 2017/11/01. <https://doi.org/10.1080/17461391.2016.1218939>.
2. Glaister M, Gissane C. Caffeine and Physiological Responses to Submaximal Exercise: A Meta-Analysis. *International journal of sports physiology and performance*. 2017;1–23. Epub 2017/09/06. <https://doi.org/10.1123/ijsp.2017-0312> PMID: 28872376.
3. Souza DB, Del Coso J, Casonatto J, Polito MD. Acute effects of caffeine-containing energy drinks on physical performance: a systematic review and meta-analysis. *European journal of nutrition*. 2017; 56(1):13–27. Epub 2016/10/21. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1331-9> PMID: 27757591.
4. Doherty M, Smith PM. Effects of caffeine ingestion on exercise testing: a meta-analysis. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*. 2004; 14(6):626–46. Epub 2005/01/20. PMID: 15657469.
5. Grgic J, Trexler ET, Lazinica B, Pedisic Z. Effects of caffeine intake on muscle strength and power: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2018; 15:11. Epub 2018/03/13. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0216-0> PMID: 29527137; PubMed Central PMCID: PMC5839013.
6. Davis JM, Zhao Z, Stock HS, Mehl KA, Buggy J, Hand GA. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284(2):R399–404. Epub 2002/10/26. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00386.2002> PMID: 12399249.
7. El Yacoubi M, Ledent C, Menard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. *Br J Pharmacol*. 2000; 129(7):1465–73. Epub 2000/04/01. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703170> PMID: 10742303; PubMed Central PMCID: PMC1571962.
8. Elmenhorst D, Meyer PT, Matusch A, Winz OH, Bauer A. Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET. *J Nucl Med*. 2012; 53(11):1723–9. Epub 2012/09/12. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.105114> PMID: 22966134.
9. Graham TE. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2001; 31(11):785–807. Epub 2001/10/05. <https://doi.org/10.2165/00007256-200131110-00002> PMID: 11583104.
10. Del Coso J, Estevez E, Mora-Rodriguez R. Caffeine effects on short-term performance during prolonged exercise in the heat. *Medicine and science in sports and exercise*. 2008; 40(4):744–51. Epub 2008/03/05. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181621336> PMID: 18317369.
11. Davis JK, Green JM. Caffeine and anaerobic performance: ergogenic value and mechanisms of action. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2009; 39(10):813–32. Epub 2009/09/18. <https://doi.org/10.2165/11317770-000000000-00000> PMID: 19757860.
12. Ammon HP. Biochemical mechanism of caffeine tolerance. *Archiv der Pharmazie*. 1991; 324(5):261–7. Epub 1991/05/01. PMID: 1888264.
13. Fredholm BB. Are the actions of methylxanthines due to antagonism of adenosine. *Trends Pharmacol Sci*. 1980; 1:129–32.
14. Sokmen B, Armstrong LE, Kraemer WJ, Casa DJ, Dias JC, Judelson DA, et al. Caffeine use in sports: considerations for the athlete. *Journal of strength and conditioning research*. 2008; 22(3):978–86. Epub 2008/04/29. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181660cec> PMID: 18438212.
15. Dodd SL, Brooks E, Powers SK, Tulley R. The effects of caffeine on graded exercise performance in caffeine naive versus habituated subjects. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 1991; 62(6):424–9. Epub 1991/01/01. PMID: 1893906.
16. Goncalves LS, Painelli VS, Yamaguchi G, Oliveira LF, Saunders B, da Silva RP, et al. Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985)*. 2017; 123(1):213–20. Epub 2017/05/13. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00260.2017> PMID: 28495846.
17. Bell DG, McLellan TM. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985)*. 2002; 93(4):1227–34. Epub 2002/09/18. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00187.2002> PMID: 12235019.

18. Irwin C, Desbrow B, Ellis A, O'Keeffe B, Grant G, Leveritt M. Caffeine withdrawal and high-intensity endurance cycling performance. *J Sports Sci.* 2011; 29(5):509–15. Epub 2011/02/01. <https://doi.org/10.1080/02640414.2010.541480> PMID: 21279864.
19. Van Soeren MH, Graham TE. Effect of caffeine on metabolism, exercise endurance, and catecholamine responses after withdrawal. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985).* 1998; 85(4):1493–501. Epub 1998/10/07. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.4.1493> PMID: 9760346.
20. Beaumont R, Cordery P, Funnell M, Mears S, James L, Watson P. Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. *J Sports Sci.* 2017; 35(19):1920–7. Epub 2016/10/21. <https://doi.org/10.1080/02640414.2016.1241421> PMID: 27762662.
21. Areta JL, Irwin C, Desbrow B. Inaccuracies in caffeine intake quantification and other important limitations in recent publication by Goncalves et al. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985).* 2017; 123(5):1414. Epub 2017/11/24. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00489.2017> PMID: 29167205.
22. Stadheim HK, Spencer M, Olsen R, Jensen J. Caffeine and performance over consecutive days of simulated competition. *Medicine and science in sports and exercise.* 2014; 46(9):1787–96. Epub 2014/08/19. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000288> PMID: 25134002.
23. Kamimori GH, Joubert A, Otterstetter R, Santaromana M, Eddington ND. The effect of the menstrual cycle on the pharmacokinetics of caffeine in normal, healthy eumenorrheic females. *European journal of clinical pharmacology.* 1999; 55(6):445–9. Epub 1999/09/24. PMID: 10492057.
24. Edvardsen E, Hem E, Anderssen SA. End criteria for reaching maximal oxygen uptake must be strict and adjusted to sex and age: a cross-sectional study. *PLoS One.* 2014; 9(1):e85276. Epub 2014/01/24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085276> PMID: 24454832; PubMed Central PMCID: PMC3891752.
25. Hachana Y, Attia A, Nassib S, Shephard RJ, Chelly MS. Test-retest reliability, criterion-related validity, and minimal detectable change of score on an abbreviated Wingate test for field sport participants. *Journal of strength and conditioning research.* 2012; 26(5):1324–30. Epub 2012/04/21. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3182305485> PMID: 22516906.
26. Inbar O, Bar-Or O, Skinner JS. *The Wingate anaerobic test: John Wiley & Sons; 1996.*
27. Salinero JJ, Lara B, Abian-Vicen J, Gonzalez-Millan C, Areces F, Gallo-Salazar C, et al. The use of energy drinks in sport: perceived ergogenicity and side effects in male and female athletes. *Br J Nutr.* 2014; 112(9):1494–502. Epub 2014/09/13. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002189> PMID: 25212095.
28. Hopkins WG, Marshall SW, Batterham AM, Hanin J. Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Medicine and science in sports and exercise.* 2009; 41(1):3–13. Epub 2008/12/19. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31818cb278> PMID: 19092709.
29. McLellan TM, Caldwell JA, Lieberman HR. A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2016; 71:294–312. Epub 2016/10/30. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.001> PMID: 27612937.
30. Fredholm BB, Yang J, Wang Y. Low, but not high, dose caffeine is a readily available probe for adenosine actions. *Mol Aspects Med.* 2017; 55:20–5. Epub 2016/12/05. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.011> PMID: 27915051.
31. Fredholm BB. Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine. *Acta physiologica Scandinavica.* 1982; 115(2):283–6. Epub 1982/06/01. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1982.tb07078.x> PMID: 6291335.
32. Chou DT, Khan S, Forde J, Hirsh KR. Caffeine tolerance: behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. *Life Sci.* 1985; 36(24):2347–58. Epub 1985/06/17. PMID: 2989634.
33. Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 1999; 19(10):4011–22. Epub 1999/05/11. PMID: 10234030.
34. Haskell CF, Kennedy DO, Wesnes KA, Scholey AB. Cognitive and mood improvements of caffeine in habitual consumers and habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology.* 2005; 179(4):813–25. Epub 2005/01/29. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2104-3> PMID: 15678363.
35. Attwood AS, Higgs S, Terry P. Differential responsiveness to caffeine and perceived effects of caffeine in moderate and high regular caffeine consumers. *Psychopharmacology.* 2007; 190(4):469–77. Epub 2006/12/01. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0643-5> PMID: 17136398.
36. Evans M, Tierney P, Gray N, Hawe G, Macken M, Egan B. Acute Ingestion of Caffeinated Chewing Gum Improves Repeated Sprint Performance of Team Sports Athletes With Low Habitual Caffeine Consumption. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2017:1–25. Epub 2017/11/02. <https://doi.org/10.1123/ijnsnem.2017-0057>.

37. Tarnopolsky M, Cupido C. Caffeine potentiates low frequency skeletal muscle force in habitual and non-habitual caffeine consumers. *J Appl Physiol* (1985). 2000; 89(5):1719–24. Epub 2000/10/29. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.5.1719> PMID: 11053318.
38. Del Coso J, Munoz-Fernandez VE, Munoz G, Fernandez-Elias VE, Ortega JF, Hamouti N, et al. Effects of a caffeine-containing energy drink on simulated soccer performance. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31380. Epub 2012/02/22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031380> PMID: 22348079; PubMed Central PMCID: PMC3279366.
39. Del Coso J, Portillo J, Munoz G, Abian-Vicen J, Gonzalez-Millan C, Munoz-Guerra J. Caffeine-containing energy drink improves sprint performance during an international rugby sevens competition. *Amino Acids*. 2013; 44(6):1511–9. Epub 2013/03/07. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1473-5> PMID: 23462927.
40. Del Coso J, Salinero JJ, Gonzalez-Millan C, Abian-Vicen J, Perez-Gonzalez B. Dose response effects of a caffeine-containing energy drink on muscle performance: a repeated measures design. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2012; 9(1):21. Epub 2012/05/10. <https://doi.org/10.1186/1550-2783-9-21> PMID: 22569090; PubMed Central PMCID: PMC3461468.
41. Lara B, Ruiz-Vicente D, Areces F, Abian-Vicen J, Salinero JJ, Gonzalez-Millan C, et al. Acute consumption of a caffeinated energy drink enhances aspects of performance in sprint swimmers. *Br J Nutr*. 2015; 114(6):908–14. Epub 2015/08/19. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002573> PMID: 26279580.
42. Perez-Lopez A, Salinero JJ, Abian-Vicen J, Valades D, Lara B, Hernandez C, et al. Caffeinated energy drinks improve volleyball performance in elite female players. *Med Sci Sports Exerc*. 2015; 47(4):850–6. Epub 2014/07/23. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000455> PMID: 25051390.
43. Salinero JJ, Lara B, Ruiz-Vicente D, Areces F, Puente-Torres C, Gallo-Salazar C, et al. CYP1A2 Genotype Variations Do Not Modify the Benefits and Drawbacks of Caffeine during Exercise: A Pilot Study. *Nutrients*. 2017; 9(3). Epub 2017/03/14. <https://doi.org/10.3390/nu9030269> PMID: 28287486; PubMed Central PMCID: PMC5372932.

ANEXO

ARTÍCULO 4

Time course and magnitude of tolerance to the ergogenic effect of caffeine on the second ventilatory threshold.

Article

Time Course and Magnitude of Tolerance to the Ergogenic Effect of Caffeine on the Second Ventilatory Threshold

Carlos Ruiz-Moreno ¹, Beatriz Lara ¹, Jorge Gutiérrez-Hellín ², Jaime González-García ¹ and Juan Del Coso ^{3,*}

¹ Exercise Physiology Laboratory, Camilo José Cela University, 28692 Villanueva de la Cañada, Spain; cruizm@ucjc.edu (C.R.-M.); blara@ucjc.edu (B.L.); jgonzalez@ucjc.edu (J.G.-G.)

² Faculty of Health Sciences, Francisco de Vitoria University, 28223 Pozuelo de Alarcón, Spain; jorge.gutierrez@ufv.es

³ Centre for Sport Studies, Rey Juan Carlos University, 28943 Fuenlabrada, Spain

* Correspondence: juan.delcoso@urjc.es

Received: 28 October 2020; Accepted: 9 December 2020; Published: 10 December 2020

Abstract: Pre-exercise caffeine ingestion has been shown to increase the workload at ventilatory threshold, suggesting an ergogenic effect of this stimulant on submaximal aerobic exercise. However, the time course of tolerance to the effect of caffeine on ventilatory threshold is unknown. This study aimed to determine the evolution of tolerance to the ergogenic effect of caffeine on the ventilatory threshold. **Methods:** Eleven participants (age 32.3 ± 4.9 yrs, height 171 ± 8 cm, body mass 66.6 ± 13.6 kg, $VO_{2max} = 48.0 \pm 3.8$ mL/kg/min) took part in a longitudinal, double-blind, placebo-controlled, randomized, crossover experimental design. Each participant took part in two identical treatments: in one treatment, participants ingested a capsule containing 3 mg of caffeine per kg of body mass per day (mg/kg/day) for twenty consecutive days; in the other treatment, participants ingested a capsule filled with a placebo for the same duration and frequency. During these treatments, participants performed a maximal ramp test on a cycle ergometer three times per week and the second ventilatory threshold (VT_2) was assessed by using the ventilatory equivalents for oxygen and carbon dioxide. **Results:** A two-way ANOVA with repeated measures (substance \times time) revealed statistically significant main effects of caffeine ($p < 0.01$) and time ($p = 0.04$) on the wattage obtained at VT_2 , although there was no interaction ($p = 0.09$). In comparison to the placebo, caffeine increased the workload at VT_2 on days 1, 4, 6 and 15 of ingestion ($p < 0.05$). The size of the ergogenic effect of caffeine over the placebo on the workload at VT_2 was progressively reduced with the duration of the treatment. In addition, there were main effects of caffeine ($p = 0.03$) and time ($p = 0.16$) on VO_2 obtained at VT_2 , with no interaction ($p = 0.49$). Specifically, caffeine increased oxygen uptake at VT_2 on days 1 and 4 ($p < 0.05$), with no other caffeine–placebo differences afterwards. For heart rate obtained at VT_2 , there was a main effect of substance ($p < 0.01$), while the overall effect of time ($p = 0.13$) and the interaction ($p = 0.22$) did not reach statistical significance. Heart rate at VT_2 was higher with caffeine than with the placebo on days 1 and 4 ($p < 0.05$). The size of the effect of caffeine on VO_2 and heart at VT_2 tended to decline over time. **Conclusion:** Pre-exercise intake of 3 mg/kg/day of caffeine for twenty days enhanced the wattage obtained at VT_2 during cycling ramp tests for ~15 days of ingestion, while there was a progressive attenuation of the size of the ergogenic effect of caffeine on this performance variable. Therefore, habituation to caffeine through daily ingestion may reduce the ergogenic effect of this stimulant on aerobic exercise of submaximal intensity.

Keywords: exercise performance; sport performance; endurance performance; nutrition; endurance athlete

1. Introduction

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a substance naturally found in coffee, tea, yerba mate and cocoa and is also added to foods and beverages due to its potent effect to increase alertness and to reduce fatigue. As a result, caffeine has become the most widely consumed psychostimulant in the world [1]. Caffeine also has a strong performance-enhancing effect [2] and it is widely used by athletes of numerous sport disciplines before and during competitions to enhance their physical performance [3]. In recent years, there has been a strong body of evidence, based on systematic reviews and meta-analyses, pointing towards an ergogenic effect of caffeine during endurance-like exercise activities [4–7] when caffeine is taken acutely in moderate doses (from 3 to 9 mg of caffeine per kg of body mass). These studies confirm the utility of acute caffeine intake to enhance the time to fatigue [8] and the mean power output during prolonged exercise trials [6], and the reduction in the time employed to complete a fixed amount of work during time trials [9]. The performance-enhancing effect of acute caffeine intake on endurance exercise may be associated to the effect of this substance to enhance maximal oxygen uptake [10], the exercise intensity at the anaerobic threshold [11,12] or the use of fat as a fuel, enabling higher muscle glycogen available late in exercise [13,14]. However, little is known about the magnitude of the ergogenic effect of caffeine on endurance performance when the substance is ingested chronically. Thus, to date, it is unknown if those endurance athletes consuming caffeine daily are benefiting from this substance during training and competition.

The main physiological mechanism behind the performance-enhancing effect of caffeine on endurance exercise is associated to caffeine's capacity to block A₁, A_{2a} and A_{2b} adenosine receptors on the central nervous system [15], although other local effects have also been proposed as contributing mechanisms [16,17]. The blockade of adenosine receptors with caffeine intake, confirmed in both animals [18] and humans [19], is based on three different characteristics of caffeine when ingested orally: rapid absorption in the gut [20], its capacity to pass through all biological membranes, including the blood–brain barrier, due to its lipophilic nature [21] and its structural similarity to adenosine [22]. There, after acute caffeine ingestion and its posterior distribution through different tissues, caffeine hinders adenosine-specific receptors. This blockade eliminates, in part, the fatiguing effect of adenosine on the central nervous system, which explains the benefits for enhanced endurance performance. Interestingly, the ergogenic effect of acute caffeine intake increases with the duration of the exercise activity, suggesting that caffeine may better inhibit the negative effect of adenosine of physical performance as the exercise duration increases [4]. However, Fredholm [23] reported a growth in the number of adenosine receptors in the brain cortex of rats when these animals received caffeine for two weeks. Therefore, chronic intake of caffeine causes an increase in the number of adenosine-binding sites, which may reduce the efficacy of caffeine to block the deleterious effects of adenosine during exercise. This investigation led to the hypothesis that caffeine's ergogenicity diminishes along with chronic ingestion, but evidence in humans is contradictory.

When comparing the ergogenic response to caffeine in individuals with low/no daily caffeine intake versus individuals habituated to caffeine, it has been found that habituated individuals respond to caffeine at a similar magnitude as their unhabituated counterparts [24–26]. Although this finding contradicts the existence of tolerance to the ergogenic effect of caffeine, other researchers have found that unhabituated individuals responded better to caffeine than habituated individuals [27], while individuals with high chronic intakes of caffeine obtain fewer benefits of this stimulant even after the use of high doses of caffeine [28]. In this regard, the threshold used to classify individuals as habituated/unhabituated to caffeine greatly varied across investigations [29], which troubles the obtaining of definitive conclusions from these cross-sectional investigations. Up until now, there have been only two investigations that have used a longitudinal research protocol to induce a controlled habituation to caffeine [10,30]. Both investigations agreed on the existence of tolerance to the benefits of caffeine on exercise performance when this substance is ingested chronically in a dose of 3 mg/kg/day for 20 [10] and 28 days [30]. In these two investigations, a progressive tolerance to the ergogenic response of caffeine in comparison to a placebo/control trial was evident, either on the workload attained during a maximal graded exercise test on a cycle ergometer [10] or on the work

produced during a 30-min cycling trial. Nevertheless, it is unknown how chronic intake of caffeine may affect submaximal aerobic exercise performed at exercise intensities close to the anaerobic threshold. This information may be valuable to understand how chronic intake of caffeine affects the efficacy of this substance to enhance exercise performance during prolonged activities and it may be useful to plan the use of caffeine in the long-term during endurance training programs. For all these reasons, this study aimed to determine the evolution of tolerance to the ergogenic effect of caffeine on the ventilatory threshold when the substance is ingested for twenty consecutive days. We hypothesized that daily intake of caffeine would progressively reduce the effect of caffeine on the workload attained in the second ventilatory threshold.

2. Materials and Methods

Participants: Eleven healthy active individuals (8 men and 3 women) were recruited to participate in this study (mean \pm SD: age = 32.3 ± 4.9 years; height = 171 ± 8 cm; body mass = 66.6 ± 13.6 kg; body fat percentage = $16.6 \pm 5.0\%$; and maximal oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{max}}$) = 48.0 ± 3.8 mL/kg/min). Inclusion criteria were: age between 18 and 40 years; consistent aerobic training (at least 4 days of endurance exercise per week, with at least 45 min of exercise per day); low caffeine consumption (<50 mg of caffeine per day) as defined by Filip et al. [29]; negative smoking status; absence of chronic cardiopulmonary and musculoskeletal diseases; absence of allergy to caffeine and absence of musculoskeletal injuries in the three months prior to the onset of the study. Participants were excluded if they reported medication or dietary supplementation usage within the previous month or any type of menstrual disorders in the sample of female participants. Participants were encouraged to keep a stable endurance fitness level throughout the experiment by keeping their habitual training routines. In addition, participants were informed about the need of avoiding caffeine-containing products and food and any other nutritional supplements for the duration of the study. The willingness to fulfill these standardizations, in addition to the satisfaction of the inclusion/exclusion criteria, was key in the recruitment process of the participants. The week prior to the onset of the experiment, the participants were fully informed of the research procedures, standardizations and the risks associated with the study and gave their informed written consent to participate in the investigation. The study was approved by the Camilo José Cela Institutional Review Board. The required sample size was determined a priori using G*Power software [31]. At least ten participants were required to detect an effect size of 0.66 in oxygen uptake at the workload that produced the ventilatory threshold with the ingestion of caffeine, with a power of 0.80 and the two-tailed α level set at 0.05. This calculation was based on the data provided by Berry et al. when investigating the effect of caffeine on the ventilatory threshold [11].

Experimental design: A longitudinal, double-blind, placebo-controlled, randomized crossover experimental design was used in this study. Each participant took part in two identical treatments and, thus, acted as his/her own control: in one treatment, participants ingested an unidentifiable capsule containing 3 mg of caffeine per kg of body mass for twenty consecutive days; in another treatment, the participants ingested a capsule with the exact same appearance but filled with a placebo (cellulose), which was ingested for the same duration and frequency as in the caffeine treatment. The capsule was ingested daily at 9:00 AM with water and at least 8 h after dinner of the previous day (i.e., in a fasted state). Each twenty-day treatment was identical, except for the substance under investigation: on days 1, 4, 6, 8, 13, 15, 18 and 20 of each treatment, participants ingested the assigned capsule 45 min before performing a maximal ramp exercise test on a cycle ergometer to determine performance variables at the second ventilatory threshold. Each treatment was preceded by a pre-treatment trial (i.e., day 0), aiming to assess the performance variables before the onset of each treatment. On day 0, participants performed the same experimental procedures as in the remaining experimental trials but without ingestion of any capsule. Day 11 also included a measurement of performance, but it was different because the assigned capsule was ingested after—not before—the exercise testing. The experimental procedures on day 11 aimed to have a “control day” at the halfway point of the treatments to aid in identifying differences in the caffeine–placebo comparisons in the subsequent days. All trials were carried out in a laboratory with a dry temperature

of 21.3 ± 0.3 °C and a relative humidity of $30 \pm 10\%$. There was a week between treatments to wash-out substances. The results of this protocol on $\text{VO}_{2\text{max}}$ and maximal wattage during the ramp test have been published elsewhere [10].

Experimental protocol: For the month before the onset of the experiment, participants were encouraged to avoid all sources of dietary caffeine in order to eliminate any habituation to this stimulant. One week before the onset of the first treatment, participants underwent routine medical screening to ensure that they were in good health and suitable for the experiment. Within the week prior to the onset of the experiment, participants were also familiarized twice with all the experimental protocols and body mass was measured (± 50 g, Radwag, Radom, Poland) to calculate caffeine dosage. On day 0 of each treatment, participants were provided with a plastic bag containing 20 unidentifiable capsules with the assigned treatment. Participants received a daily reminder through a mobile application to ingest the capsule in the morning. On each experimental day (except for days 0 and 11), participants ingested the capsule in the laboratory and rested for 45 min on a stretcher. On days 0 and 11, participants rested on the stretcher, but this resting period was not preceded by capsule ingestion. Afterwards, participants performed a 10-min standardized warm-up on the cycle ergometer and then performed the ramp exercise test. During the performance test, the initial load was set at 50 watts and it was progressively increased by 25 watts per min until exhaustion. Participants chose their pedaling rate between 70 and 90 rpm, but they had to replicate it in all experimental trials. During the incremental exercise test, pulmonary ventilation, end-tidal partial pressure of oxygen ($P_{\text{ET}}\text{O}_2$), oxygen uptake (VO_2), end-tidal partial pressure of carbon dioxide ($P_{\text{ET}}\text{CO}_2$) and carbon dioxide production (VCO_2) were continuously measured and recorded by means of a breath-by-breath analyzer (Metalyzer 3B, Cortex, Leipzig, Germany). These variables were used to calculate the second ventilatory threshold (VT_2) by using the ventilatory equivalents for oxygen (VE/VO_2) and carbon dioxide (VE/VCO_2) and end-tidal partial pressure changes in accordance with the combined procedure described by Gaskell et al. [32]. Briefly, visual interpretation of each graph was independently performed by two trained researchers who were blinded to the treatments under investigation. These researchers established VT_2 as the point that elicited an increase in ventilation respect to VO_2 (i.e., $\uparrow \text{VE}/\text{VO}_2$) and VCO_2 (i.e., $\uparrow \text{VE}/\text{VCO}_2$) while end-tidal partial pressure of carbon dioxide decreased ($\downarrow P_{\text{ET}}\text{CO}_2$). With this protocol, the decrement in $P_{\text{ET}}\text{CO}_2$, which starts at VT_2 , is evident until the end of the test [33]. A third researcher was sought only in case of disagreement between the two researchers [34]. Once the VT_2 was agreed, data on wattage, VO_2 , heart rate and VE/VO_2 and carbon dioxide VE/VCO_2 at this point were extracted for analysis by using an average of the data for the last 15 s of the workload at VT_2 .

Statistical analysis: Data were analyzed by using the statistical package SPSS v 20.0 for statistical analysis. Initially, the existence of normal distribution was tested for each variable with the Shapiro–Wilk test. All the variables presented a normal distribution and parametric statistics were used afterwards. Additionally, the sphericity assumption was checked with Mauchly’s test. If this assumption presented a probability of $p < 0.05$, the Greenhouse–Geisser correction was used. We performed a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (substance \times time) in each variable to determine the differences in the caffeine–placebo comparison on each day of treatment and differences in respect to day 0 within each treatment. In the case of a significant F value in the ANOVAs, the differences between groups were identified with LSD post-hoc tests. The significance level was set at $p < 0.05$. The effect size \pm 95% confidence intervals (CI) was also calculated in all caffeine–placebo comparisons on the same day of treatment by using Cohen’s d units [35]. The magnitude of the effect size (ES) was interpreted as follows: less than 0.2 = trivial; between 0.2 and 0.6 = small; between 0.6 and 1.2 = moderate; between 1.2 and 2.0 = large; between 2.0 and 4.0 = very large; higher than 4.0 = extremely large [36].

3. Results

The two-way ANOVA revealed statistically significant main effects of substance ($F = 26.11$; $p < 0.01$) and time ($F = 1.99$; $p = 0.04$) on the wattage obtained at VT_2 , although there was no interaction between these two factors ($F = 1.73$; $p = 0.09$). On day 0, the wattage obtained at VT_2 was similar

between the placebo and caffeine (195 ± 27 vs. 202 ± 18 W, respectively; $p = 0.27$). In the 20-day placebo treatment, the wattage at VT₂ was higher on day 13 when compared to day 0 ($p = 0.02$), with no other differences in respect to day 0. In the 20-day caffeine treatment, the wattage at VT₂ was higher on days 1, 4 and 15 than on day 0 ($p < 0.05$). In addition, the workload attained at VT₂ was higher with caffeine than with the placebo on days 1, 4, 6 and 15 ($p < 0.05$). The ES of the caffeine–placebo comparison was moderate on days 1, 4 and 6 and it decreased to small afterwards (Figure 1).

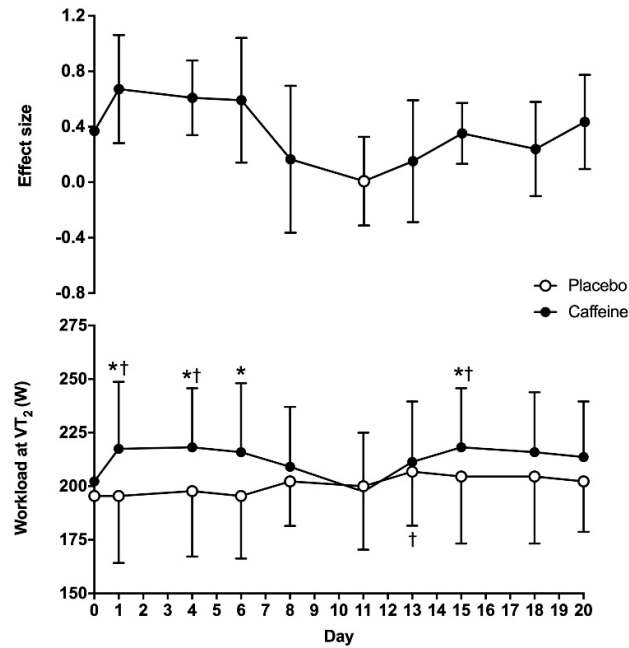


Figure 1. Workload at the second ventilatory threshold (VT₂) during a cycling ramp test with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel shows effect sizes ($\pm 95\%$ confidence intervals) for all timepoint comparisons between caffeine and the placebo. The lower panel depicts data presented as mean \pm standard deviation. (*) Caffeine different from placebo for the same timepoint at $p < 0.05$. (†) Different from day 0 within the same treatment at $p < 0.05$.

For VO₂ obtained at VT₂, there were main effects of substance ($F = 6.65$; $p = 0.03$) and time ($F = 3.25$; $p = 0.16$), with no interaction between these two factors ($F = 0.95$; $p = 0.49$). The VO₂ obtained at VT₂ on day 0 was similar between the placebo and caffeine (2.39 ± 0.43 vs. 2.47 ± 0.44 L/min, respectively; $p = 0.31$). In the placebo treatment, VO₂ at VT₂ was higher on days 13 and 15 when compared to day 0 ($p < 0.05$), with no other differences in this treatment. In the caffeine treatment, VO₂ at VT₂ was higher on days 1, 4, 13, 15 and 20 than on day 0 ($p < 0.05$). In addition, VO₂ at VT₂ was higher with caffeine than with the placebo on days 1 and 4 ($p < 0.05$). The ES of the caffeine–placebo comparison was small on days 1 and 4 and became trivial afterwards (Figure 2).

For heart rate obtained at VT₂, there was a main effect of substance ($F = 18.5$; $p < 0.01$), while the overall effect of time ($F = 1.93$; $p = 0.13$) and the interaction ($F = 1.51$; $p = 0.22$) did not reach statistical significance. On day 0, heart rate at VT₂ was similar between the placebo and caffeine treatments (153 ± 14 vs. 158 ± 16 beats/min, respectively; $p = 0.15$). Heart rate at VT₂ was higher with caffeine than with the placebo on days 1 and 4 ($p < 0.05$). The ES of the caffeine–placebo comparison was small on days 1, 4 and 6 and became trivial afterwards (Figure 3).

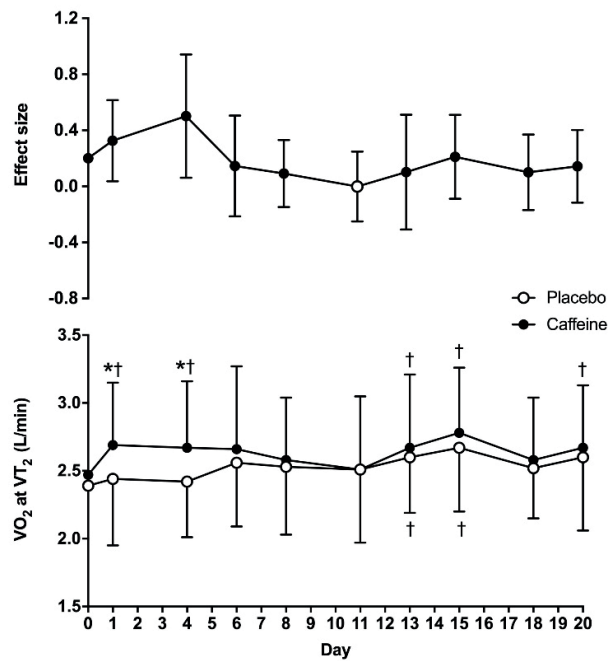


Figure 2. Oxygen uptake (VO₂) at the second ventilatory threshold (VT₂) during a cycling ramp test with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or placebo for 20 consecutive days. The upper panel shows effect sizes (±95% confidence intervals) for all timepoint comparisons between caffeine and a placebo. The lower panel depicts data presented as mean ± standard deviation. (*) Caffeine different from placebo for the same timepoint at $p < 0.05$. (†) Different from day 0 within the same treatment at $p < 0.05$.

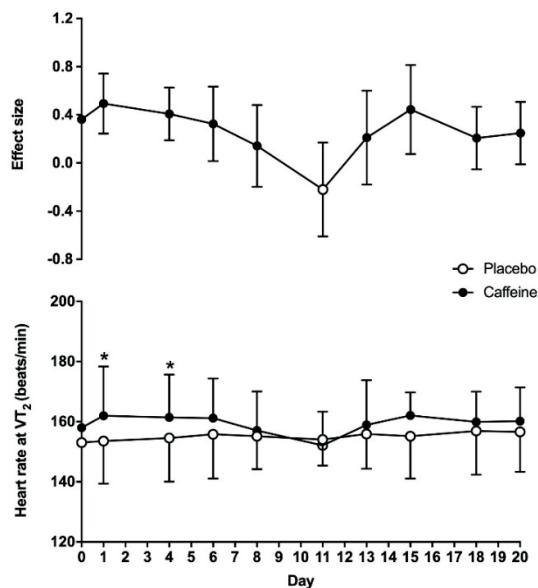


Figure 3. Heart rate at the second ventilatory threshold (VT₂) during a cycling ramp test with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel shows effect sizes (±95% confidence intervals) for all timepoint comparisons between caffeine and the placebo. The lower panel depicts data presented as mean ± standard deviation. (*) Caffeine different from placebo for the same timepoint at $p < 0.05$.

There was a main effect of substance ($F = 9.73$; $p = 0.01$) on the ventilatory equivalent of O_2 at VT_2 , while the overall effect of time ($F = 1.90$; $p = 0.12$) and the interaction between the two ($F = 0.76$; $p = 0.65$) did not reach statistical significance for this variable. The ventilatory equivalent of O_2 at VT_2 was similar between the placebo and caffeine on day 0 (Table 1, $p = 0.17$). The ventilatory equivalent of O_2 at VT_2 was higher on days 4, 6, 13 and 15 with caffeine than with the placebo ($p < 0.05$). Regarding the ventilatory equivalent of CO_2 at VT_2 , there was a main effect of substance ($F = 23.6$; $p < 0.01$), while the overall effect of time ($F = 1.23$; $p = 0.28$) and the interaction between the two ($F = 0.72$; $p = 0.68$) did not reach statistical significance. The ventilatory equivalent of CO_2 at VT_2 was similar between the placebo and caffeine on day 0 ($p = 0.09$) but it was higher with caffeine than with the placebo on day 1 ($p = 0.04$).

Table 1. Ventilatory equivalent for oxygen (O_2) and for carbon dioxide (CO_2) at the second ventilatory threshold (VT_2) during a cycling ramp test with the administration of 3 mg of caffeine per kg of body mass per day or a placebo for twenty consecutive days.

Day	Ventilatory Equivalent of O_2 at VT_2			Ventilatory Equivalent of CO_2 at VT_2		
	Placebo	Caffeine	Effect Size ($\pm 95\%$ CI)	Placebo	Caffeine	Effect Size ($\pm 95\%$ CI)
0	28.2 \pm 3.2	29.9 \pm 3.5	0.5 (-0.2/1.1)	24.4 \pm 2.1	25.8 \pm 2.2	0.4 (-0.1/1.0)
1	29.8 \pm 4.8	30.6 \pm 3.9	0.2 (-0.4/0.7)	25.1 \pm 2.6	27.2 \pm 3.7 *	0.7 (0.2/1.2)
4	29.0 \pm 2.5	32.8 \pm 4.1 *	1.3 (0.5/2.1)	25.1 \pm 2.0	26.0 \pm 2.4	0.4 (-0.3/1.1)
6	28.1 \pm 2.4	30.6 \pm 2.4 *	0.9 (0.3/1.4)	25.7 \pm 1.9	26.6 \pm 2.7	0.4 (-0.3/1.1)
8	28.6 \pm 1.8	30.6 \pm 4.5	0.9 (-0.2/2.1)	25.0 \pm 1.4	26.0 \pm 2.4	0.6 (-0.4/1.6)
11	28.3 \pm 2.3	29.3 \pm 2.8	0.4 (0.0/0.7)	25.1 \pm 1.9	25.4 \pm 1.5	0.1 (-0.5/0.8)
13	28.2 \pm 2.2	30.5 \pm 2.6 *	0.9 (0.5/1.3)	25.7 \pm 1.5	26.6 \pm 1.7	0.5 (-0.1/1.1)
15	28.0 \pm 3.1	30.9 \pm 2.5 *	0.8 (0.2/1.4)	26.5 \pm 2.6	26.7 \pm 2.1	0.1 (-0.2/0.4)
18	29.9 \pm 2.8	32.2 \pm 3.8	0.7 (-0.1/1.4)	25.8 \pm 2.0	26.0 \pm 2.5	0.0 (-0.4/0.4)
20	29.0 \pm 3.7	31.2 \pm 3.4	0.6 (-0.2/1.1)	26.4 \pm 2.2 †	26.2 \pm 2.0	0.1 (-0.7/0.6)

CI = confidence interval; (*) the value in the caffeine trial was different to the value in the placebo trial within the same day of intervention ($p < 0.05$). The effect size was calculated in all caffeine–placebo comparisons within the same day of intervention.

4. Discussion

The transition point indicating that the obtaining energy within skeletal muscle changes from aerobic pathways to a mixed model of aerobic-plus-anaerobic metabolism is one of the most important physiological variables for endurance sports. In this regard, the exercise intensity that enables maximum production of energy through aerobic pathways, without a concomitant accumulation of metabolites from anaerobic metabolism, is a key parameter with several practicalities, such as monitoring the efficacy of endurance training, estimating endurance performance and designing training programs to achieve specific adaptations [37]. Although there are several methods to assess this metabolic transition point, the use of pulmonary ventilatory thresholds during incremental intensity exercise is one of the most accurate methods to estimate the exercise intensity that produces the anaerobic threshold [38]. Interestingly, evidence clearly indicates that acute caffeine intake increases endurance performance [4–7], but the effect of caffeine on physiological variables attained at pulmonary thresholds has been less well investigated [11], and the ergogenic effect of caffeine at this point is even less clear [39]. In addition, there is no previous investigation that has determined whether the potential effect of caffeine intake on increasing the exercise intensity at the ventilatory threshold is maintained when caffeine is ingested chronically. The resolution of these two topics is key for those endurance athletes using caffeine or caffeine-containing supplements before training and competitions, as caffeine may modify the exercise intensity at the anaerobic threshold, while its chronic use may progressively reduce the potential ergogenic benefit of caffeine due to habituation to this substance. With these motivations, the purpose of this study was to determine the time course of tolerance to the ergogenic effect of caffeine on the second ventilatory threshold during a cycling ramp test when the substance is ingested for twenty consecutive days. To allow a clearer picture of the habituation to the ergogenic effect of caffeine, we

used a double statistical approach with *p* values and effect sizes. The main outcomes of this study are as follows: (a) on the first day of ingestion, pre-exercise ingestion of 3 mg caffeine/kg body mass increased the workload at VT₂ by $7.7 \pm 9.7\%$ when compared to the ingestion of a placebo. This acute ergogenic effect was associated to increases in VO₂ and heart rate at VT₂. (b) There was a main effect of caffeine on the workload attained at VT₂. However, in the caffeine–placebo comparison, within the same day of treatment, the effect of caffeine to increase the exercise workload at VT₂ over the placebo was only present for the first two weeks of ingestion (except for day 8 and day 13), while the size of the benefit of caffeine on this performance variable decreased progressively over time (Figure 1). (c) There was a main effect of caffeine on heart rate and VO₂ at VT₂, but the caffeine–placebo pairwise comparisons revealed that caffeine did not produce any statistically significant difference over the placebo on these variables after 4 days of consecutive ingestion (Figures 2 and 3). Additionally, there was a progressive reduction in the influence of caffeine on VO₂ and heart rate at VT₂ with chronic ingestion. Taken together, this information suggests that acute caffeine intake has the capacity to increase the absolute workload attained at VT₂ during a cycling ramp test, which may explain the performance-enhancing effect of this stimulant during aerobic exercise of submaximal intensity. However, it seems apparent that the ergogenic effect of caffeine progressively diminished with chronic ingestion, and it was not present, in statistically significant terms, after 15 days of consecutive ingestion. As practical information, endurance athletes seeking to obtain performance-enhancing effects of caffeine during endurance training or competition should avoid habituation to caffeine, as the existence of a gradual tolerance to caffeine’s ergogenicity on VT₂ seems clear.

Acute caffeine intake has the potential to increase oxygen uptake at the ventilatory threshold (7 mg/kg, [11]); reduces the accumulation of blood lactate for the same exercise intensity (10 and 15 mg/kg, [12]); increases time to exhaustion at an intensity 10% below the anaerobic threshold (5 mg/kg, [40]); augments the ventilatory response for a given amount of CO₂ produced during exercise (650 mg of caffeine [41]). All these findings point towards an ergogenic benefit of acute caffeine consumption to enhance performance when exercising at an intensity close to the anaerobic threshold. However, to our knowledge, this is the first investigation that finds an increase in the exercise intensity that enables VT₂ with the ingestion of a moderate dose of caffeine (i.e., 3 mg of caffeine per kg of body mass). The obtaining of a higher absolute workload at VT₂ may be the result of different physiological responses produced by acute caffeine intake. First, the blockade of adenosine receptors due to caffeine may produce a higher neuromuscular activation during exercise, ultimately affecting performance [42]. In addition, the blockade of adenosine receptors also increases the liberation of dopamine, norepinephrine and serotonin, among other neurotransmitters, which may allow lower perceived fatigue during exercise [43]. Caffeine also produces a respirogenic effect that augments ventilation during exercise of submaximal intensity [39,44], which may allow a higher maintenance of muscle pH through the buffering of H⁺ and the elimination of non-metabolic CO₂ by respiration [45]. This mechanism was found in the current investigation as the ventilatory equivalent of CO₂ at VT₂ with caffeine was higher than with the placebo (Table 1). Finally, better muscle oxygenation during aerobic exercise of submaximal intensity may delay the use of anaerobic metabolism during incremental exercise [16], allowing higher exercise intensity at the aerobic–anaerobic transition point. All this evidence supports that acute caffeine intake increases the workload at VT₂, suggesting a potential benefit of this stimulant for aerobic exercise performed close to the anaerobic threshold.

There was a main effect of caffeine on wattage, heart rate and VO₂ attained at VT₂, which indicates that this substance was effective in modifying the point at which the second ventilatory threshold is obtained during a ramp cycling test. Interestingly, there was no interaction between substance × time in any of these three variables, which may indicate that the effect of caffeine over the placebo was not affected by the duration of the treatment. However, the caffeine–placebo pairwise comparison indicates that the performance benefit of caffeine on VT₂ was obtained on several days for the first two weeks of chronic caffeine administration, but it disappeared afterwards. Furthermore, the size of the ergogenic benefit of caffeine on VT₂ gradually reduced with long-term ingestion, at least up to twenty days of daily administration. This confirms the existence of tolerance

to the ergogenic benefit of caffeine for aerobic exercise of submaximal intensity, as it has been found in aerobic exercise of maximal intensity (i.e., exercise at $\text{VO}_{2\text{max}}$) [10] and in the maximum amount of work produced during 30 min of exercise [30]. Habituation to caffeine and subsequent tolerance to the benefits of this stimulant on exercise have been long speculated [46], but evidence with well-controlled investigations has been only recently provided. With the current evidence, it seems clearer that chronic ingestion of caffeine, at a dose of 3 mg/kg/day, produces tolerance to some of the benefits of caffeine on exercise, at least during laboratory testing. Interestingly, caffeine intake was still able to produce a non-significant but measurable effect on the workload attained at VT_2 (Figure 1) and at $\text{VO}_{2\text{max}}$ [10] after twenty days of consecutive ingestion. This may indicate that caffeine intake still produced small benefits after twenty days of ingestion, although the magnitude of this effect was minor. Future investigations with longer periods of chronic caffeine ingestion are needed to unveil whether caffeine ergogenicity disappears with daily ingestion for >20 days. In addition, it is also necessary to investigate whether acute ingestion of a higher dose of caffeine (i.e., >3 mg/kg) in habituated individuals may offset the tolerance developed with the ingestion of 3 mg/kg/day.

The present research has different limitations that should be discussed. First, VT_2 was identified using a visual interpretation of the relationships of VE/VO_2 , VE/VCO_2 , $\text{P}_{\text{ET}}\text{O}_2$, and $\text{P}_{\text{ET}}\text{CO}_2$ with exercise intensity. Although this is a valid methodology [32], this method is subject to human error and interpretation. To reduce this error, two trained researchers independently established VT_2 at each day of caffeine/placebo ingestion without any knowledge about the individuals or the substances under investigation. In most cases, they agreed in their visual identification of VT_2 and the seeking of a third researcher to solve disagreements was anecdotal. Second, we used VT_2 as an estimate of the anaerobic threshold during exercise of increasing intensity. The use of blood samples to assess lactate concentration would be helpful to improve the identification of the aerobic–anaerobic transition point. Finally, we used a moderate dose of caffeine to induce tolerance and the time of chronic ingestion was relatively short. Therefore, the results of the current investigation may not apply to endurance athletes with higher daily caffeine ingestion or those using caffeine chronically for several months/years. Despite these limitations, the current investigation may be helpful for athletes and coaches when planning the use of caffeine during endurance training and competition.

5. Conclusions

The acute intake of caffeine (i.e., day 1 of ingestion) at a dose of 3 mg per kg of body mass, prior to exercise, increased the workload attained at VT_2 with additional and concomitant benefits on VO_2 and heart rate at VT_2 . In addition, there was a main effect of caffeine on the workload, VO_2 and heart rate attained at VT_2 when the substance was ingested chronically for twenty days, with no substance \times time interaction. However, the magnitude of the ergogenic response of caffeine progressively attenuated with the daily ingestion of this substance for twenty days. This is because caffeine–placebo pairwise comparisons revealed that caffeine was only effective to enhance the exercise workload at VT_2 for the first two weeks of chronic caffeine administration, but this benefit disappeared afterwards. Regarding VO_2 and heart rate at VT_2 , the benefits of caffeine were only present for the first four days of consecutive administration. From a practical perspective, a dose of 3 mg of caffeine per kg of body mass may be acutely employed to enhance exercise intensity at the second ventilatory threshold, which may represent a potential benefit for training and competition. However, the progressive tolerance to the ergogenic benefit of caffeine on VT_2 suggests the convenience of avoiding daily ingestion of caffeine. Although scarce, there is evidence suggesting that daily ingestion of caffeine for 8 weeks, in conjunction with aerobic training, does not provide further benefits than aerobic training without supplementation [47]. In addition, daily ingestion of caffeine for twenty days may produce a progressive rise in some adverse effects associated to caffeine intake, such as increased nervousness and vigor, irritability, insomnia and diuresis [48]. Perhaps the use of caffeine only before a competition and/or before high-intensity training may be an acceptable option to maximize the benefits of this stimulant while reducing tolerance and side effects.

Author Contributions: Conceptualization, C.R.-M., B.L., J.G.-H., J.G.-G. and J.D.C.; methodology, C.R.-M., B.L., J.G.-H., J.G.-G. and J.D.C.; formal analysis, C.R.-M., J.G.-H. and J.G.-G.; investigation, C.R.-M., B.L. and J.D.C.; resources, B.L.; writing—original draft preparation, C.R.-M.; writing—review and editing, B.L., J.G.-H., J.G.-G. and J.D.C.; supervision, J.D.C.; project administration, J.D.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors wish to thank the participants for their invaluable contribution to the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Reyes, C.M.; Cornelis, M.C. Caffeine in the diet: Country-level consumption and guidelines. *Nutrients* **2018**, *10*, 1772.
2. Salinero, J.J.; Lara, B.; Del Coso, J. Effects of acute ingestion of caffeine on team sports performance: A systematic review and meta-analysis. *Res. Sport. Med.* **2019**, *27*, 238–256.
3. Aguilar-Navarro, M.; Muñoz, G.; Salinero, J.J.; Muñoz-Guerra, J.; Fernández-álvarez, M.; Plata, M.D.M.; Del Coso, J. Urine caffeine concentration in doping control samples from 2004 to 2015. *Nutrients* **2019**, *11*, 286.
4. Shen, J.G.; Brooks, M.B.; Cincotta, J.; Manjourides, J.D. Establishing a relationship between the effect of caffeine and duration of endurance athletic time trial events: A systematic review and meta-analysis. *J. Sci. Med. Sport* **2019**, *22*, 232–238.
5. Grgic, J.; Grgic, I.; Pickering, C.; Schoenfeld, B.J.; Bishop, D.J.; Pedisic, Z. Wake up and smell the coffee: Caffeine supplementation and exercise performance—An umbrella review of 21 published meta-analyses. *Br. J. Sports Med.* **2019**, *54*, 681–688.
6. Southward, K.; Rutherford-Markwick, K.J.; Ali, A. The Effect of Acute Caffeine Ingestion on Endurance Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sport. Med.* **2018**, *48*, 1913–1928.
7. Souza, D.B.; Del Coso, J.; Casonatto, J.; Polito, M.D. Acute effects of caffeine-containing energy drinks on physical performance: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 13–27.
8. Doherty, M.; Smith, P.M. Effects of caffeine ingestion on exercise testing: A meta-analysis. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2004**, *14*, 626–646.
9. Ganio, M.S.; Klau, J.F.; Casa, D.J.; Armstrong, L.E.; Maresh, C.M. Effect of Caffeine on Sport-Specific Endurance Performance: A Systematic Review. *J. Strength Cond. Res.* **2009**, *23*, 315–324.
10. Lara, B.; Ruiz-Moreno, C.; Salinero, J.J.; Del Coso, J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210275.
11. Berry, M.J.; Stoneman, J.V.; Weyrich, A.S.; Burney, B. Dissociation of the ventilatory and lactate thresholds following caffeine ingestion. *Med. Sci. Sports Exerc.* **1991**, *23*, 463–469.
12. McNaughton, L.A.R.S. Two levels of caffeine ingestion on blood lactate and free fatty acid responses during incremental exercise. *Res. Q. Exerc. Sport* **1987**, *58*, 255–259.
13. Ruiz-Moreno, C.; Gutiérrez-Hellín, J.; Amaro-Gahete, F.J.; González-García, J.; Giráldez-Costas, V.; Pérez-García, V.; Del Coso, J. Caffeine increases whole-body fat oxidation during 1 h of cycling at Fatmax. *Eur. J. Nutr.* **2020**, in press.
14. Costill, D.L.; Dalsky, G.P.; Fink, W.J. Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance. *Med. Sci. Sports* **1978**, *10*, 155–158.
15. Meeusen, R.; Roelands, B.; Spriet, L.L. Caffeine, Exercise and the Brain. In *Limits of Human Endurance*; Nestle Nutrition Institute Workshop Series; Karger Publishers: Basel, Switzerland, 2013; Volume 76, pp. 1–12.
16. Ruiz-Moreno, C.; Lara, B.; Brito de Souza, D.; Gutiérrez-Hellín, J.; Romero-Moraleda, B.; Cuéllar-Rayó, Á.; Del Coso, J. Acute caffeine intake increases muscle oxygen saturation during a maximal incremental exercise test. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *86*, 861–867.
17. Mohr, M.; Nielsen, J.J.; Bangsbo, J. Caffeine intake improves intense intermittent exercise performance and reduces muscle interstitial potassium accumulation. *J. Appl. Physiol.* **2011**, *111*, 1372–1379.
18. Davis, J.M.; Zhao, Z.; Stock, H.S.; Mehl, K.A.; Buggy, J.; Hand, G.A. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2003**, *284*, R399–R404.
19. Elmenhorst, D.; Meyer, P.T.; Matusch, A.; Winz, O.H.; Bauer, A. Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: In vivo quantification with 18F-CPFPX and PET. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 1723–1729.

20. Magkos, F.; Kavouras, S.A. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 535–562.
21. McCall, A.L.; Millington, W.R.; Wurtman, R.J. Blood-brain barrier transport of caffeine: Dose-related restriction of adenosine transport. *Life Sci.* **1982**, *31*, 2709–2715.
22. Chee, H.K.; Oh, S.J. Molecular Vibration-Activity Relationship in the Agonism of Adenosine Receptors. *Genom. Inform.* **2013**, *11*, 282.
23. Fredholm, B.B. Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends Pharmacol. Sci.* **1980**, *1*, 129–132.
24. De Gonçalves, L.S.; de Painelli, V.S.; Yamaguchi, G.; Oliveira, L.F. de; Saunders, B.; da Silva, R.P.; Maciel, E.; Artioli, G.G.; Roschel, H.; Gualano, B. Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. *J. Appl. Physiol.* **2017**, *123*, 213–220.
25. Dodd, S.L.; Brooks, E.; Powers, S.K.; Tulley, R. The effects of caffeine on graded exercise performance in caffeine naive versus habituated subjects. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **1991**, *62*, 424–429.
26. Grgic, J.; Mikulic, P. Acute effects of caffeine supplementation on resistance exercise, jumping, and Wingate performance: No influence of habitual caffeine intake. *Eur. J. Sport Sci.* **2020**, 1–11, doi:10.1080/17461391.2020.1817155.
27. Bell, D.G.; McLellan, T.M. Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J. Appl. Physiol.* **2002**, *93*, 1227–1234.
28. Wilk, M.; Krzysztolik, M.; Filip, A.; Zajac, A.; Del Coso, J. The effects of high doses of caffeine on maximal strength and muscular endurance in athletes habituated to caffeine. *Nutrients* **2019**, *11*, 1912.
29. Filip, A.; Wilk, M.; Krzysztolik, M.; Del Coso, J. Inconsistency in the ergogenic effect of caffeine in athletes who regularly consume caffeine: Is it due to the disparity in the criteria that defines habitual caffeine intake? *Nutrients* **2020**, *12*, 1087.
30. Beaumont, R.; Cordery, P.; Funnell, M.; Mears, S.; James, L.; Watson, P. Chronic ingestion of a low dose of caffeine induces tolerance to the performance benefits of caffeine. *J. Sports Sci.* **2017**, *35*, 1920–1927.
31. Faul, F.; Erdfelder, E.; Lang, A.G.; Buchner, A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. In *Proceedings of the Behavior Research Methods; Psychonomic Society Inc.*: Chicago, IL, USA, 2007; Volume 39, pp. 175–191.
32. Gaskell, S.E.; Ruby, B.C.; Walker, A.J.; Sanchez, O.A.; Serfass, R.C.; Leon, A.S. Validity and reliability of combining three methods to determine ventilatory threshold. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2001**, *33*, 1841–1848.
33. Lucia, A.; Hoyos, J.; Perez, M.; Chicharro, J.L. Heart rate and performance parameters in elite cyclists: A longitudinal study. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2000**, *32*, 1777–1782.
34. Coso, J. Del; Hamouti, N.; Aguado-Jimenez, R.; Mora-Rodriguez, R. Respiratory compensation and blood pH regulation during variable intensity exercise in trained versus untrained subjects. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2009**, *107*, 83–93.
35. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd ed.; Lawrence Erlbaum Associates: Jersey City, NJ, USA, 1988.
36. Hopkins, W.G.; Marshall, S.W.; Batterham, A.M.; Hanin, J. Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2009**, *41*, 3–13.
37. Coen, B.; Schwarz, L.; Urhausen, A.; Kindermann, W. Control of Training in Middle- and Long-Distance Running by Means of the Individual Anaerobic Threshold. *Int. J. Sports Med.* **1991**, *12*, 519–524.
38. Ghosh, A.K. Anaerobic threshold: Its concept and role in endurance sport. *Malays. J. Med. Sci.* **2004**, *11*, 24–36.
39. Karapetian, G.K.; Engels, H.J.; Gretebeck, K.A.; Gretebeck, R.J. Effect of caffeine on LT, VT and HRVT. *Int. J. Sports Med.* **2012**, *33*, 507–513.
40. Denadai, B.S.; Denadai, M.L.D.R. Effects of caffeine on time to exhaustion in exercise performed below and above the anaerobic threshold. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1998**, *31*, 581–585.
41. D’Urzo, A.D.; Jhirad, R.; Jenne, H.; Avendano, M.A.; Rubenstein, I.; D’Costa, M.; Goldstein, R.S. Effect of caffeine on ventilatory responses to hypercapnia, hypoxia, and exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* **1990**, *68*, 322–328.
42. Del Coso, J.; Estevez, E.; Mora-Rodriguez, R. Caffeine effects on short-term performance during prolonged exercise in the heat. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2008**, *40*, 744.

43. Goldstein, E.R.; Ziegenfuss, T.; Kalman, D.; Kreider, R.; Campbell, B.; Wilborn, C.; Taylor, L.; Willoughby, D.; Stout, J.; Graves, B.S.; et al. International society of sports nutrition position stand: Caffeine and performance. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2010**, *7*, 5.
44. Spriet, L.L.; MacLean, D.A.; Dyck, D.J.; Hultman, E.; Cederblad, G.; Graham, T.E. Caffeine ingestion and muscle metabolism during prolonged exercise in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **1992**, *262*, E891–E898.
45. Péronnet, F.; Aguilaniu, B. Lactic acid buffering, nonmetabolic CO₂ and exercise hyperventilation: A critical reappraisal. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2006**, *150*, 4–18.
46. Sökmen, B.; Armstrong, L.E.; Kraemer, W.J.; Casa, D.J.; Dias, J.C.; Judelson, D.A.; Maresh, C.M. Caffeine use in sports: Considerations for the athlete. *J. Strength Cond. Res.* **2008**, *22*, 978–986.
47. Malek, M.H.; Housh, T.J.; Coburn, J.W.; Beck, T.W.; Schmidt, R.J.; Housh, D.J.; Johnson, G.O. Effects of eight weeks of caffeine supplementation and endurance training on aerobic fitness and body composition. *J. Strength Cond. Res.* **2006**, *20*, 751–755.
48. Ruiz-Moreno, C.; Lara, B.; Salinero, J.J.; de Souza, D.B.; Ordovás, J.M.; Del Coso, J. Time course of tolerance to adverse effects associated with the ingestion of a moderate dose of caffeine. *Eur. J. Nutr.* **2020**, *59*, 3293–3302.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO ARTÍCULO 5

Time course of tolerance to adverse effects associated with the ingestion of a moderate dose of caffeine.



Time course of tolerance to adverse effects associated with the ingestion of a moderate dose of caffeine

Carlos Ruiz-Moreno¹ · Beatriz Lara¹ · Juan José Salinero¹ · Diego Brito de Souza¹ · José M. Ordovás^{2,3} · Juan Del Coso⁴

Received: 2 July 2019 / Accepted: 17 December 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose This study aimed to identify and describe the time course of tolerance to the most common caffeine-induced side effects.

Methods Eleven participants took part in a crossover, double-blind placebo-controlled experimental design. In one phase, participants ingested 3 mg/kg/day of caffeine for 20 days, while in another phase, they ingested a placebo. Resting heart rate and blood pressure were measured three times per week during each 20-day phase and a quantitative survey was used to categorise the magnitude of side effects.

Results In the pairwise comparison with the placebo, the ingestion of caffeine increased systolic ($+7.8 \pm 10.1\%$, $P < 0.05$) and diastolic blood pressure ($+6.4 \pm 12.9\%$ $P < 0.05$) for the first 8 days of ingestion, but then this effect became attenuated for both outcomes (on day 20, $-1.1 \pm 4.3\%$ and $+0.9 \pm 9.6\%$, respectively). The ingestion of caffeine did not affect heart rate at any time point. Caffeine increased the feelings of nervousness and vigour and the rating of gastrointestinal complaints, insomnia and diuresis at several time points in the treatment ($P < 0.05$) and they did not disappear after 20 days of ingestion.

Conclusions The daily intake of 3 mg/kg of caffeine induced a meaningful elevation in arterial blood pressure that disappeared after 8 days. However, other caffeine-induced effects such as increased nervousness and vigour, irritability, insomnia and diuresis remained after 20 days of consecutive caffeine ingestion. Although there was clear tolerance to the effect of caffeine on blood pressure, the persistence of other side effects suggests the inconvenience of maintaining a chronic caffeine intake, at least at the dose of 3 mg/kg/day.

Keywords Stimulants · Side effects · Heart rate · Blood pressure · Habituation

Introduction

Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) is a natural alkaloid present in varying quantities in the leaves, fruits, and seeds of various plants [1]. Caffeine can also be artificially synthesised to be included in dietary supplements and

over-the-counter medications with different forms of administration [2]. Caffeine is the most commonly consumed psychoactive drug in current society even though it has no nutritional value and is not essential for any physiological process [3]. The high consumption of caffeinated products worldwide is related to the wide range of physiological outcomes provided by this substance. The capacity of caffeine to increase physical [4–6] and cognitive performance [7] at moderate doses (from 2 to 9 mg/kg) is likely the most common driver of caffeine use [8]. In addition, the regular intake of coffee, the primary source of caffeine intake in modern societies, has been related to additional benefits on health status such as decreased risk of several cancers, cardiovascular disease, Parkinson's disease and type-2 diabetes [9].

Despite its purported benefits, the ingestion of a moderate dose of caffeine has also been associated with several deleterious effects such as increased anxiety, insomnia,

✉ Juan Del Coso
juan.delcoso@urjc.es

¹ Exercise Physiology Laboratory, Camilo José Cela University, Madrid, Spain

² USDA ARS, Human Nutrition Research Center On Aging At Tufts University, Boston, MA 02111, USA

³ IMDEA Food Institute, CEI UAM + CSIC, Madrid, Spain

⁴ Centre for Sport Studies, Rey Juan Carlos University, C/Camino del Molino, s/n, 28943 Fuenlabrada, Spain

gastrointestinal distress, and particularly with augmented blood pressure at rest. The magnitude and duration of these drawbacks are dose-dependent and might present some interindividual variability due to genetics [10]. Interestingly, most investigations show that habitual intake of caffeine does not increase the risk of high blood pressure values [11, 12] because tolerance to the cardiovascular effects of caffeine is developed over time [13]. In agreement with this finding, tolerance to both the positive and negative side effects of caffeine ingestion has been identified with cross-sectional experiments that compared regular caffeine consumers vs. naïve caffeine users [14–16]. However, there is also evidence that disputes the existence of tolerance to the effects of caffeine [17–20]. The lack of consistency among these investigations might be due to the differences in the methods used to categorise the consumption of caffeine, the diverse duration of the protocols used to induce tolerance, and the differences in the dose of caffeine administered/ingested [15]. Nevertheless, the differences in the mechanisms behind caffeine-induced positive and negative side effects might also explain the inconsistency regarding tolerance to the effects of caffeine.

The blockade of central A₁ and A_{2A} adenosine receptors is the most likely mechanism behind the ergogenic and the anxiogenic-like effects of caffeine [21]. On the other hand, the caffeine-induced release of catecholamines, which act on α - and β -adrenergic receptors, is the main factor responsible for the cardiovascular outcomes induced by caffeine intake. Interestingly, it has been found that chronic intake of caffeine produces an increase in the number of binding sites for adenosine in the brain cortex [22], while α - and β -adrenergic receptors appear to be down-regulated or unchanged [23]. Thus, the time course of tolerance to caffeine-induced effects on performance might follow a different pattern to the tolerance to the caffeine-induced effects on cardiovascular variables.

For this reason, the objective of the current investigation was to describe the evolution of the caffeine-induced changes on resting blood pressure, heart rate and the magnitude of side effects typically associated with caffeine intake. To avoid the effects of situational/interindividual variables on tolerance to caffeine, we used an experiment with a crossover design in which participants acted as their own controls.

Materials and methods

Participants

Eleven healthy active individuals volunteered to participate in this investigation. Participants were recruited through advertisements placed on the university campus. Their (mean \pm standard deviation; SD) age, body height, body mass

and body fat percentage were 32.3 ± 4.9 years, 171 ± 8 cm, 66.6 ± 13.6 kg, $16.6 \pm 5.0\%$, respectively. In the sample, the three women always started the treatments at the beginning of their luteal phase. Before the onset of the current study, a sample size calculation was performed according to the data provided by an investigation carried out by Robertson et al. [13] in which tolerance to caffeine-induced effects on blood pressure was measured throughout 1 week (the caffeine dose employed was 250 mg). The sample size calculation, performed to have a statistical power of at least 80%, indicated that at least two participants were needed to obtain a caffeine-induced effect on systolic blood pressure after 1 day of caffeine ingestion (expected difference = 11.7 mmHg), while at least 11 participants were needed to detect an effect of caffeine on this variable after 3 days of consecutive ingestion (expected difference = 4.0 mmHg). All the recruited participants were low caffeine consumers (less than 100 mg/day of caffeine, measured with a valid semi-quantitative food frequency questionnaire [24]). They were non-smokers and were not taking medication or dietary supplements for the duration of the study. We selected healthy young individuals to isolate the time course of tolerance to adverse effects of caffeine from the mechanisms related to disease and aging. Participants were informed of the experimental procedures and possible discomforts associated with the chronic intake of caffeine and gave their informed written consent to participate in the investigation. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Camilo José Cela University, in accordance with the latest version of the Declaration of Helsinki.

Experimental design

A double-blind, placebo-controlled, crossover experimental design was used for this investigation. In a randomised order, participants ingested either an unidentifiable capsule containing 3 mg/kg of caffeine (equivalent to 3–4 cups of espresso coffee) each day during 20 consecutive days, or the same capsule, but filled with a placebo for the same duration. Although both caffeine (100% purity, Bulk Powders, United Kingdom) and placebo (cellulose; 100% purity, Guinama, Spain) capsules were ingested every day, the experimental trials to assess the effect of caffeine over placebo on the variables under investigation were performed 2 days before the onset of each protocol of ingestion (day 0), and three times per week (i.e. day 1, 4, 6, 8, 13, 15, 18 and 20). For the month before the onset of the experiments, participants refrained from all sources of dietary caffeine to eliminate any prior habituation to this stimulant. The consumption of dietary caffeine (coffee, tea, chocolate, sodas, energy drinks, etc.) and other stimulants was discontinued for the duration of the experiments and compliance was verified with dietary recalls.

Experimental protocol

On the days of the trial visits, participants arrived at the laboratory (09.00 am) in a fasted state (at least 8 h after their last meal). Upon arrival, the capsule with the assigned experimental treatment was provided in an unidentifiable bag and then later ingested by the participant. Then, participants rested supine for 60 min to allow for substance absorption. Resting heart rate (H10, Polar, Finland), and systolic and diastolic blood pressure (M7 Comfort, Omron, Japan; by triplicate) were measured during the last 5 min of the resting period. For these measurements, participants lay comfortably on a stretcher with an adjustable back to produce a hip flexion of 60° while both hands rested on the abdomen. In this position, a cuff was positioned around the participant's right arm and the microphone inserted in the cuff was carefully positioned over the brachial artery, following the recommendations of the manufacturer. In all trials, the same experimenter, blinded to the treatments under investigation, placed the cuff around the participant's arm and the same internal bladder—inserted within the cuff—was used for all measurements. All these standardisations were carefully replicated each day of measurement to obtain a reliable blood pressure assessment [25]. An average of three blood pressure measurements was used for analysis. The experimental procedures on day 11 were different from the remaining days of measurement: on this day, resting heart rate and the blood pressure measurements were performed before—not after—capsule intake to have a “control” situation at the mid-point of the treatments. After the resting measurements, participants performed a standardised exercise protocol the results of which have been published elsewhere [26]. Then, participants resumed their daily routines that comprised office work or university tasks while keeping a regular and stable diet and fluid regime. Participants were also encouraged to maintain a stable schedule for each daily activity, especially regarding waking up, eating and resting schedules.

On the day after each trial visit, participants completed an online survey to rate their feelings of nervousness, vigour, and irritability on a 1–10-point scale. In this survey, participants were also asked to rate the magnitude of symptoms, if any, of headache, gastrointestinal distress and muscle pain and the magnitude of other side effects such as insomnia and diuresis. This same survey has been previously employed to assess the effect of the acute ingestion of caffeine on all of these variables [3]. Participants were familiarised with the survey before its application in the experiment and they were informed that 1 point meant the minimal amount of the variable/feeling and 10 points meant the maximal amount of that variable (1 point was the value used to indicate not feeling any different from a regular day).

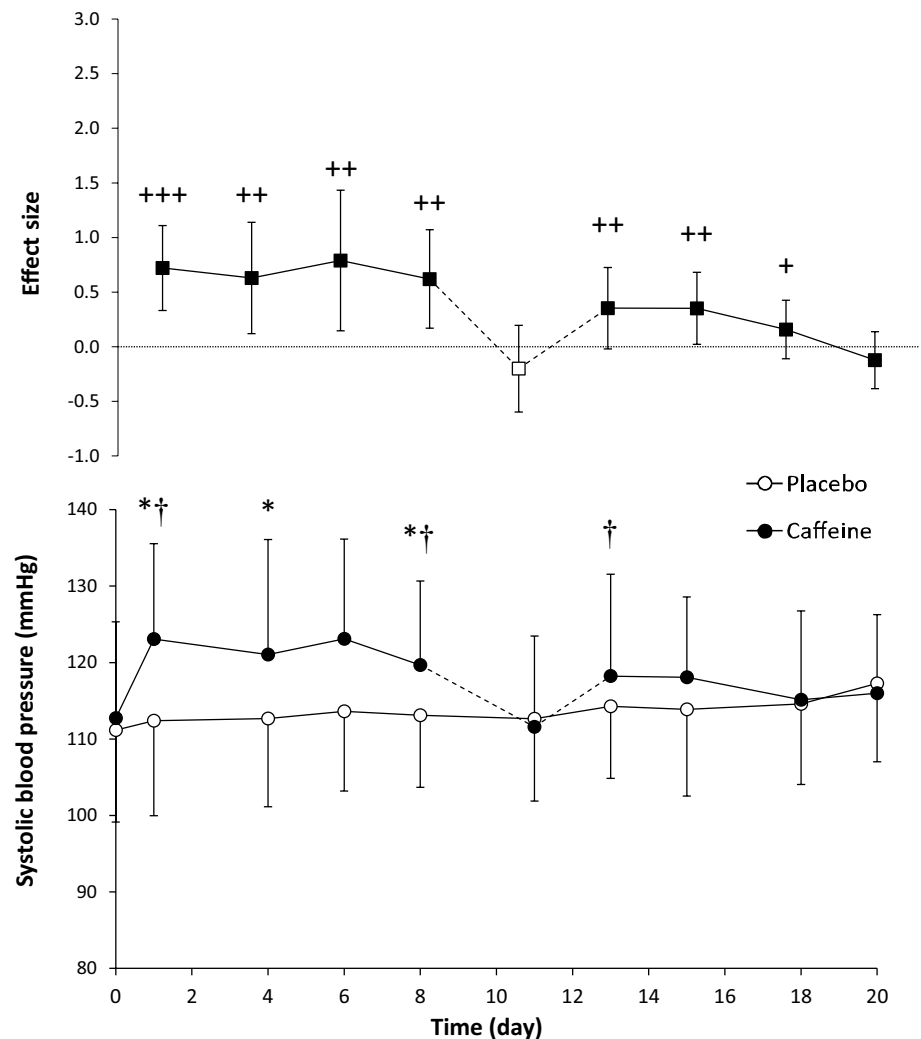
Statistical analysis

The results of each test were blindly introduced into the statistical package SPSS v 20.0 and subsequently analysed. Data on systolic blood pressure, diastolic blood pressure and resting heart rate were analysed with two-way (treatment \times day) analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA showed a significant effect on the treatment, differences in all pairwise caffeine–placebo comparisons were assessed using the Tukey post hoc test. Differences in the self-rated variables were analysed using the Wilcoxon signed-rank test. The criterion for statistical significance in all these tests was set at $P < 0.05$. The data are presented as mean \pm standard deviation. The effect size was also calculated in all pairwise comparisons to allow a magnitude-based inference approach [27]. Specifically, the effect size statistic \pm 95% confidence interval (CI) was used on log-transformed data. A qualitative descriptor was included to represent the likelihood of caffeine–placebo difference in each variable and for each day of the experimental trial. Ranges of likelihood $< 1\%$ indicated almost certainly no chances of change; 1–5%, very unlikely; 5–25%, unlikely; 25–75%, possible; 75–95%, likely; 95–99%, very likely; $> 99\%$, most likely. Differences were rated as unclear when likelihood exceeded $> 5\%$ in both positive/negative directions. Effect sizes were interpreted according to the following ranges: < 0.2 , trivial; 0.2–0.6, small; 0.6–1.2, moderate; 1.2–2.0, large; 2.0–4.0, very large and > 4.0 , extremely large [27].

Results

Figure 1 depicts systolic blood pressure fluctuations during the 20-day treatments with caffeine and placebo. Specifically, systolic blood pressure was maintained relatively constant at $\sim 114 \pm 11$ mmHg during the whole placebo treatment. The ingestion of caffeine increased systolic blood pressure over the value recorded with the placebo (main effect, $P = 0.003$). The pairwise comparison showed that systolic blood pressure was higher with caffeine on days 1, 4 and 8 ($P < 0.05$), with no other caffeine–placebo differences in the subsequent post hoc analysis. Interestingly, the magnitude of the caffeine effect on systolic blood pressure decreased during the treatment period, and the likelihood of this effect changed from very likely on day 1 to unclear on day 20. Diastolic blood pressure followed a similar pattern to systolic blood pressure; with the placebo, diastolic blood pressure was maintained relatively constant at $\sim 70 \pm 7$ mmHg during the whole treatment, but caffeine increased diastolic blood pressure (main effect, $P = 0.037$). The post hoc analysis revealed caffeine–placebo differences on days 4 and 8 (Fig. 2; $P < 0.05$). The magnitude of the

Fig. 1 Systolic blood pressure with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel depicts the effect size ($\pm 95\%$ confidence intervals) for all pairwise comparisons. Only effect sizes with a possible likelihood of difference ($>25\%$) are categorised: (++++) most likely, (+++), very likely, (++) likely, (+) possibly. The lower panel data presented as mean \pm standard deviation. (Asterisk) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$. (Dagger) Different from day 0 within the same treatment, $P < 0.05$



caffeine effect on diastolic blood pressure decreased during the treatment period and its likelihood changed from likely on day 1 to unclear on day 20. The ingestion of caffeine did not affect resting heart rate at any time point (main effect, $P = 0.239$) when compared to the administration of the placebo, whereas the magnitude of the caffeine–placebo effect was always between 0.1 and 0.3 and the likelihood unclear in all pairwise comparisons (Table 1).

Figure 3 depicts self-rated feelings of nervousness with the administration of caffeine over the placebo. The rating of nervousness was kept constant at 1.3 ± 0.8 points during the placebo treatment with no changes among days. Caffeine increased the ratings of nervousness over the placebo (main effect, $P = 0.022$), specifically in the pairwise comparisons on days 4, 6 and 13 ($P < 0.05$). The magnitude of the caffeine effect over the placebo on self-rated nervousness tended to increase with the duration of the treatment, although it was likely–most likely in all pairwise comparisons. In comparison to the placebo, caffeine also increased the feelings of vigour (main effect,

$P = 0.008$), specifically in the pairwise comparisons on days 1, 4, 6, 13, 15 and 18 ($P < 0.05$). The magnitude of the caffeine–placebo effect on vigour was moderate and likely–very likely during the whole treatment (Fig. 4).

Table 2 contains information about the self-rated values for headache, gastrointestinal distress and muscle pain. With the placebo, headache was rated as < 2 points during the whole treatment, whereas the ingestion of caffeine did not affect the ratings of headache at any time point (main effect, $P = 0.971$). However, caffeine increased the ratings of gastrointestinal distress over the placebo (main effect, $P = 0.033$), and the pairwise comparison revealed differences on day 1 and day 8 of ingestion at $P < 0.05$. The effects of caffeine to increase gastrointestinal complaints were likely–very likely until day 15 of ingestion, with unclear effects afterwards. Regarding muscle pain, caffeine only produced very likely–likely effects on days 15 and 18 of ingestion at $P < 0.05$, but the main effect for this variable did not reach statistical significance (main effect, $P = 0.174$).

Fig. 2 Diastolic blood pressure with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or placebo for 20 consecutive days. The upper panel depicts the effect size (\pm 95% confidence intervals) for all pairwise comparisons. Only effect sizes with a possible likelihood of difference ($>$ 25%) are categorised: (++++) most likely, (++++) very likely, (++) likely, (+) possibly. The lower panel data presented as mean \pm standard deviation. (Asterisk) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$. (Dagger) Different from day 0 within the same treatment, $P < 0.05$

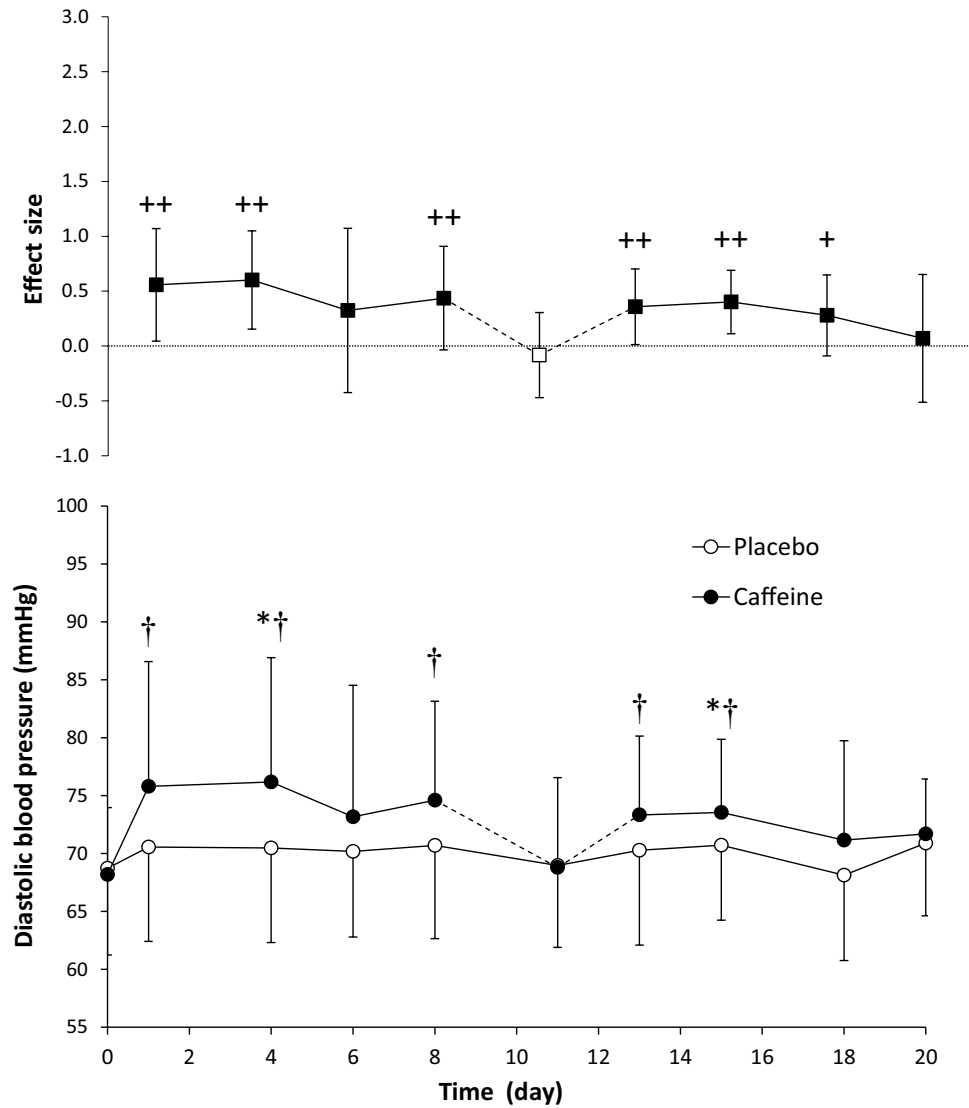
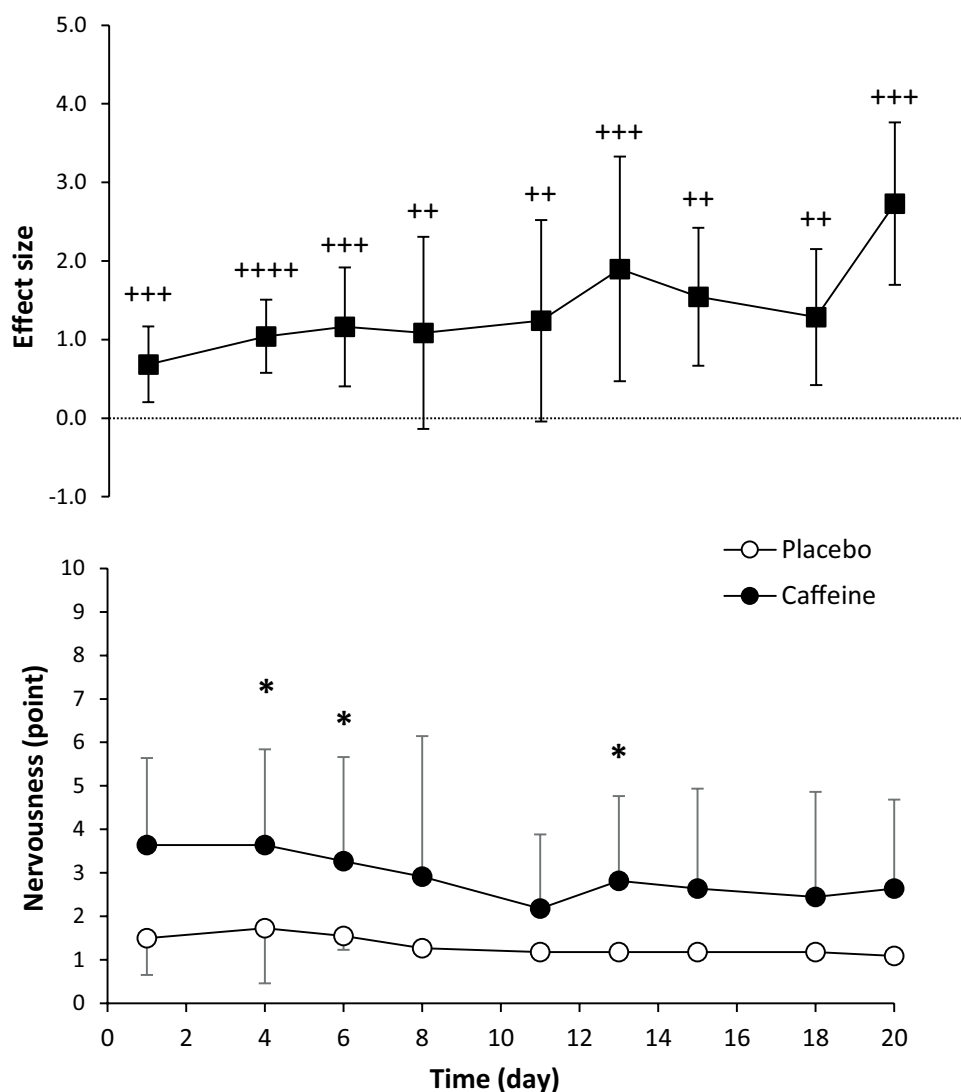


Table 1 Heart rate after caffeine ingestion with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days

Day	Heart rate		Qualitative inference
	Placebo	Caffeine	
1	52 \pm 8	53 \pm 9	Unclear
4	52 \pm 8	51 \pm 9	Unclear
6	52 \pm 8	50 \pm 9	Unclear
8	51 \pm 6	50 \pm 9	Unclear
11	53 \pm 9	53 \pm 7	Unclear
13	55 \pm 10	52 \pm 9	Unclear
15	54 \pm 10	51 \pm 7	Unclear
18	52 \pm 8	50 \pm 8	Unclear
20	53 \pm 7	50 \pm 8	Unclear

Table 3 depicts information about self-rated irritability, insomnia and diuresis during the treatments with placebo and caffeine. In comparison to the placebo, the ingestion of caffeine produced unclear effects on irritability during the first 11 days of ingestion with likely–possibly effects afterward (main effect, $P = 0.248$). Overall, caffeine increased the ratings of insomnia over the placebo (main effect, $P = 0.041$) with a pairwise difference identified on day 13 of ingestion ($P < 0.05$); caffeine effects on insomnia were very likely–possibly after 6 days of continuous ingestion and remained as likely–possibly until the end of the treatment. Finally, caffeine-induced a very likely–likely diuresis effect during the whole treatment (main effect, $P = 0.049$).

Fig. 3 Self-reported ratings of nervousness with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel depicts the effect size ($\pm 95\%$ confidence intervals) for all pairwise comparisons. Only effect sizes with a possible likelihood of difference ($>25\%$) are categorised: (++++) most likely, (++++) very likely, (++) likely, (+) possibly. The lower panel data presented as mean \pm standard deviation. (Asterisk) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$



Discussion

The current investigation aimed to describe the evolution of the tolerance, if any, to the caffeine-induced changes in resting blood pressure, heart rate and to the magnitude of several adverse effects typically associated with the consumption of caffeine. Using a crossover design with a controlled and standardised amount of caffeine, the main outcomes of this investigation were: (a) both systolic and diastolic blood pressure were elevated with the acute intake of caffeine, but this cardiovascular effect disappeared after 20 days of constant intake (Figs. 1, 2). (b) The intake of caffeine also increased the ratings of nervousness, vigour, irritability, insomnia, gastrointestinal distress and diuresis, while most of these effects were still present after 20 days of consecutive administration (Figs. 3, 4). (c) Caffeine had no measurable effect on resting heart rate nor on the ratings of headache or muscle pain. All this

information suggests tolerance to the effects of caffeine on raising blood pressure that is complete after 20 days of consecutive ingestion, while other caffeine adverse effects did not present a clear course of tolerance, at least for the duration of this investigation.

The effect of caffeine on raising blood pressure is well supported, although the magnitude of this effect depends on caffeine dosage [10]. The lack of a caffeine-induced effect on resting heart rate is also a common finding, and it has been related to compensation to accommodate the elevation in blood pressure [10]. In the current investigation, 3 mg/kg of caffeine increased systolic blood pressure by $+9.1 \pm 8.0\%$ on day 1 of ingestion, with no effect on resting heart rate (Table 1). This effect of caffeine on raising systolic blood pressure remained relatively constant for the first 8 days of consecutive ingestion and then it was progressively reduced until it was non-existent on day 20 of ingestion. A similar pattern was present in diastolic blood pressure with

Fig. 4 Self-reported ratings of vigour with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days. The upper panel depicts the effect size ($\pm 95\%$ confidence intervals) for all pairwise comparisons. Only effect sizes with a possible likelihood of difference ($> 25\%$) are categorised: (++++) most likely, (++++) very likely, (++) likely, (+) possibly. The lower panel data presented as mean \pm standard deviation. (Asterisk) Caffeine different from placebo for the same day, $P < 0.05$

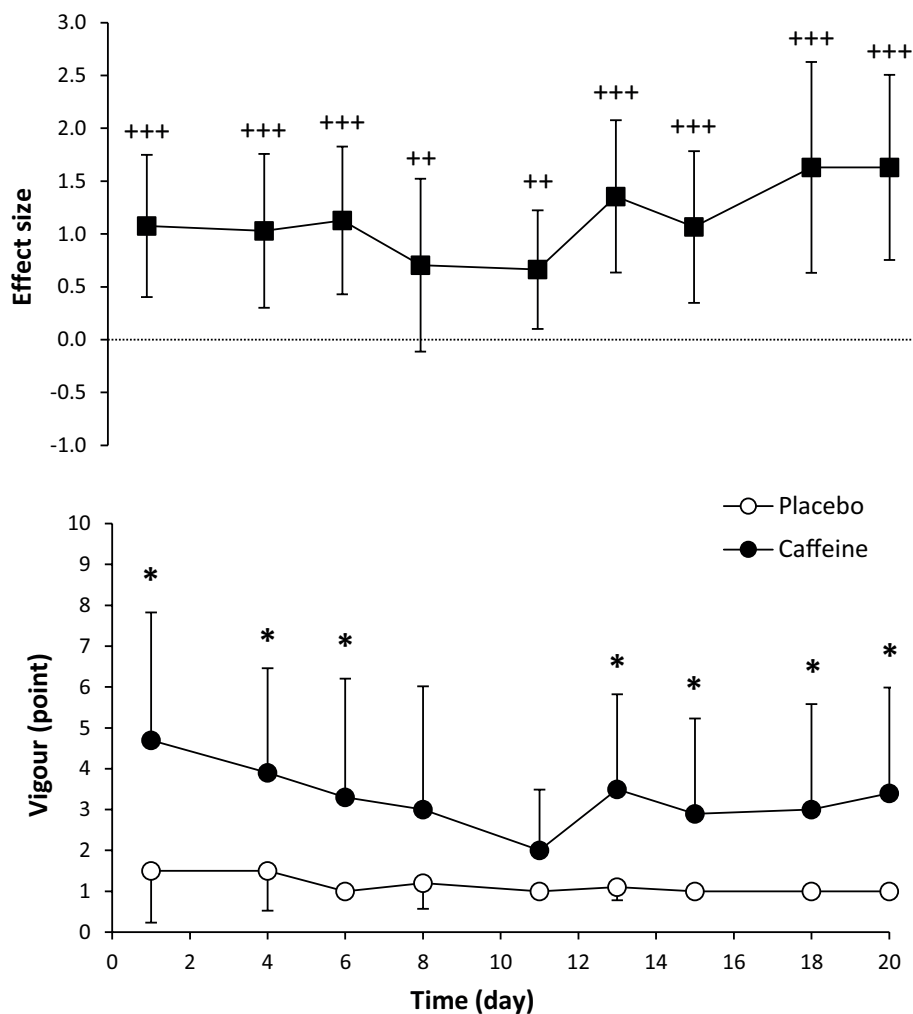


Table 2 Headache, gastrointestinal distress (GI) and muscle pain with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days

Day	Headache			GI distress			Muscle pain		
	Placebo	Caffeine	Qualitative inference	Placebo	Caffeine	Qualitative inference	Placebo	Caffeine	Qualitative inference
1	1.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.4	Unclear	1.0 \pm 0.0	2.7 \pm 2.5*	Very likely	1.5 \pm 1.0	1.9 \pm 2.1	Unclear
4	1.2 \pm 0.6	1.9 \pm 2.7	Unclear	1.0 \pm 0.0	2.8 \pm 3.1	Very likely	1.4 \pm 0.7	2.1 \pm 2.4	Unclear
6	1.8 \pm 1.9	1.6 \pm 1.3	Unclear	1.6 \pm 1.8	2.6 \pm 2.8	Unclear	2.0 \pm 2.5	2.1 \pm 2.2	Unclear
8	1.9 \pm 1.6	1.2 \pm 0.6	Unclear	1.0 \pm 0.0	2.3 \pm 1.7*	Very likely	1.6 \pm 1.3	1.6 \pm 1.6	Unclear
11	1.3 \pm 0.9	1.2 \pm 0.6	Unclear	1.0 \pm 0.0	2.3 \pm 2.5	Very likely	1.0 \pm 0.0	1.7 \pm 1.6	Unclear
13	1.2 \pm 0.6	1.2 \pm 0.4	Unclear	1.3 \pm 0.9	2.4 \pm 2.7	Likely	1.5 \pm 0.8	2.2 \pm 2.1	Unclear
15	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	Unclear	1.1 \pm 0.3	2.4 \pm 2.5	Very likely	1.0 \pm 0.0	2.3 \pm 2.2	Very likely
18	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.4	Unclear	1.2 \pm 0.6	1.8 \pm 2.1	Unclear	1.5 \pm 1.5	2.5 \pm 2.8	Likely
20	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.4	Unclear	1.0 \pm 0.0	1.5 \pm 1.5	Unclear	1.6 \pm 1.8	2.5 \pm 2.8	Unclear

All variables were assessed with 1–10-point scales where 1 point meant the minimal amount of the variable and 10 points meant the maximal amount of that variable (1 point was the value used to indicate not feeling any different from a regular day)

*Caffeine different from placebo for the same day of ingestion, $P < 0.05$

Table 3 Self-reported irritability, insomnia and diuresis, measured with a 1–10-point scale, with the administration of 3 mg/kg/day of caffeine or a placebo for 20 consecutive days

Day	Irritability			Insomnia			Diuresis		
	Placebo	Caffeine	Qualitative inference	Placebo	Caffeine	Qualitative inference	Placebo	Caffeine	Qualitative inference
1	1.1±0.3	1.4±0.9	Unclear	2.0±2.1	2.8±2.9	Unclear	1.0±0.0	2.2±1.7	Very likely
4	1.2±0.4	2.0±1.7	Unclear	2.2±2.4	3.5±3.3	Unclear	1.0±0.0	2.3±2.4	Very likely
6	1.6±2.1	1.8±2.1	Unclear	1.8±2.1	3.6±3.4	Likely	1.2±0.6	3.3±2.9	Very likely
8	1.0±0.0	1.6±1.8	Unclear	1.9±1.6	3.0±2.5	Likely	1.2±0.6	2.8±2.8	Likely
11	1.0±0.0	1.2±0.6	Unclear	2.4±2.4	3.3±3.1	Unclear	1.3±0.7	1.8±1.8	Unclear
13	1.0±0.3	1.3±0.7	Likely	1.5±0.9	3.1±2.5*	Very likely	1.1±0.3	2.2±2.0	Likely
15	1.0±0.0	1.3±0.7	Unclear	2.1±2.2	2.3±2.0	Possibly	1.1±0.3	2.0±2.0	Likely
18	1.4±1.2	1.8±1.8	Possibly	1.7±1.5	3.1±2.5	Likely	1.2±0.6	2.2±1.7	Likely
20	1.4±2.4	2.2±2.4	Possibly	2.6±2.8	2.2±2.8	Possibly	1.1±0.3	2.2±2.0	Likely

All variables were assessed with 1–10-point scales where 1 point meant the minimal amount of the variable and 10 points meant the maximal amount of that variable (1 point was the value used to indicate not feeling any different from a regular day)

*Caffeine different from placebo for the same day of ingestion, $P < 0.05$

a +7.6±10.0% increase on day 1 of caffeine ingestion and a progressively smaller effect afterwards.

These data coincide with the tolerance to caffeine effect on blood pressure described by Robertson et al. [13] but indicate that tolerance is not complete until after 20 days of consecutive caffeine ingestion (instead of the ~4 days of consecutive caffeine ingestion proposed by Robertson et al. [13]). This is evident by the particularities of day 11 of ingestion: on this day, blood pressure was measured before—instead of after—the ingestion of the assigned capsule for both caffeine and placebo treatments. This variation in the day-to-day protocol of caffeine intake was chosen to assess caffeine tolerance at the mid-point of the treatments but did not interrupt the day-to-day ingestion of the substances. On day 11, both systolic and diastolic blood pressure decreased to a similar value to those of the placebo trial (Figs. 1, 2). Interestingly, these cardiovascular variables again increased on day 13 with the administration of caffeine, confirming that caffeine was still capable of increasing blood pressure after 13 days of constant intake and no tolerance had been produced at this time. Thus, 20 days of constant caffeine ingestion might be necessary to observe complete tolerance to the effect of caffeine on raising blood pressure. Because chronically elevated blood pressure is necessary to consider this factor as a risk for cardiovascular disease [28], it is likely that the tolerance to the effect of caffeine on blood pressure eliminates most, if not all, of the negative impact of caffeine on this type of condition [9].

The ratings of the several caffeine-induced adverse effects measured in this investigation followed a time course of tolerance that was different to the above-mentioned one for blood pressure. On the one hand, self-reported levels of headache and muscle pain remained

unchanged with acute caffeine intake and thus, no tolerance was observed. The ratings of gastrointestinal complaints were likely increased for the first 8 days of ingestion and then they decreased to be unclear at the end of the treatment (Table 2). On the other hand, nervousness, vigour, irritability, insomnia and diuresis increased with caffeine over the pairwise comparison with the placebo on different days of the treatment and a maintained/increased-like pattern was present during the entire treatment with caffeine. Overall, these data indicate that several of the adverse effects experienced with the intake of caffeine are still persistent after 20 days of constant ingestion. While the absence of complete tolerance to the caffeine effect on vigour might be perceived as positive because it suggests enhanced stamina, the persistence of the remaining side effects indicates that the chronic intake of a moderate dose of caffeine might produce several drawbacks.

The disparities in the time courses of tolerance for the different caffeine-induced effects measured in this investigation might be related to the differences in the mechanisms of action of caffeine on body tissues. It is believed that the effect of caffeine on blood pressure is mainly mediated through the elevation in the serum concentration of catecholamines [13], although increased peripheral vascular resistance induced by caffeine on vascular smooth muscle might also play a role [29]. Because the increase in plasmatic levels of stress hormones induced by caffeine is progressively reduced with chronic ingestion [13], a similar and concomitant reduction of the effect of caffeine on blood pressure is then expected. Additionally, the down-regulation of α - and β -adrenergic receptors with continuous caffeine intake might also contribute to fast tolerance to the effect of caffeine on blood pressure [23].

The blockade of central A₁ and A_{2A} adenosine receptors is the most well-supported mechanism of action for all the effects of caffeine on the central nervous system [30]. There is evidence of this mechanism in both animal [31] and human models [32] when ingested at low-to-moderate doses [21]. Adenosine is a neuromodulator in the nervous system that reduces neuronal excitability through the activation of inhibitory adenosine receptors. Caffeine can block adenosine receptors, thus reducing the inhibitory effects of adenosine. This mechanism might explain both increased physical performance and the stimulant-like effects of caffeine, because both outcomes might be expected with the blockade of adenosine receptors in the brain. In this respect, it seems that both the ergogenic [26] and the stimulant-like effects of caffeine share a similar time course of tolerance, because caffeine still exerts both effects after 20 days of consecutive ingestion. Considering these results, it is suggested that caffeine still has the capacity of acting as an active competitor for the adenosine receptors even after 20 days of constant ingestion. The absence of complete tolerance to these caffeine effects is likely mediated through the increase in the de novo binding sites for adenosine created with the chronic ingestion of caffeine [22].

The present investigation has several limitations. First, the duration of the caffeine/placebo treatments was 20 days. Because the individuals considered as habitual caffeine consumers can use this substance daily for weeks or even years, the results of the current investigation might not be representative of chronic caffeine consumption. Second, tolerance to the cardiovascular and adverse effects of caffeine was tested with a moderate dose (e.g. 3 mg/kg/day). It is still possible that lower or higher doses of caffeine produce a different time course for tolerance to the effects found in this investigation. Third, only 11 participants were recruited for this investigation, so the confirmation of these results with a larger sample is required to produce a more generalised and comprehensive understanding of tolerance to caffeine effects. Last, we did not obtain blood samples during the ingestion protocols to determine plasma caffeine and catecholamine concentration. Thus, we were unable to determine the influence of the serum levels of these substances on the evolution of the effects found in this investigation.

In summary, tolerance to the effects of caffeine on the human body is a complex phenomenon, and the time course of habituation to the different caffeine-induced effects might depend on the mechanism of action of this stimulant on body tissues. The acute ingestion of 3 mg/kg of caffeine induced increased systolic and diastolic arterial blood pressure, whereas a progressive tolerance to this cardiovascular effect was present when caffeine was ingested daily over ~3 weeks. Overall, the effect of caffeine on elevating blood pressure was eliminated after 20 days of constant ingestion. In contrast, adverse effects typically associated with caffeine

intake, such as increased nervousness, increased vigour, irritability, insomnia and diuresis, remained after 20 days of ingestion. These results support the notion that the stimulant-like effect of caffeine persists after ~3 weeks of continuous moderate ingestion, but some downsides accompany this effect. Although there was an evident tolerance to the effect of caffeine on blood pressure, the persistence of other side effects suggests the inconvenience of maintaining a chronic caffeine intake, at least in the dose of 3 mg/kg/day. Further investigations should determine whether tolerance to the effect of caffeine on blood pressure is also present when the dose of caffeine is higher than 3 mg/kg/day, as the European Food Safety Authority indicates that the daily intake in Europe ranges from 37 to 310 mg per day (~0.7 and 4.2 mg/kg/day [33]). In addition, the existence of tolerance to the effect of caffeine on blood pressure should also be confirmed in older adults as they might be more prone to suffer hypertension [34] and then the “negative” impact of acute caffeine intake in increasing blood pressure could be greater in this population. Lastly, it is necessary to test the tolerance to the stimulant-like effect of caffeine using periods of chronic caffeine intake longer than 20 days.

Acknowledgements The authors wish to thank the subjects for their invaluable contribution to the study.

Author contributions CRM, BL, JJS, JMO, JC: formulated the research question. CRM, BL, JJS, JC: designed the study. CRM, BL, JJS, JC: carried it out. CRM, DBS, BL, JJS, JC: analysed the data. DBS, JMO, JC: wrote the article. CRM, DBS, BL, JJS, JMO: revised the article.

Funding This investigation did not receive any funding.

Data availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare no support from any organisation for the submitted work; no financial relationships with any organisations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; and no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

References

1. Magkos F, Kavouras SA (2005) Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:535–562. <https://doi.org/10.1080/1040-830491379245>
2. Laizure SC, Meibohm B, Nelson K et al (2017) Comparison of caffeine disposition following administration by oral solution (energy drink) and inspired powder (AeroShot) in human subjects. *Br J Clin Pharmacol* 83:2687–2694. <https://doi.org/10.1111/bcp.13389>
3. Salinero JJ, Lara B, Abian-Vicen J et al (2014) The use of energy drinks in sport: perceived ergogenicity and side effects in male

- and female athletes. *Br J Nutr* 112:1494–1502. <https://doi.org/10.1017/S0007114514002189>
4. Salinero JJ, Lara B, Del Coso J (2019) Effects of acute ingestion of caffeine on team sports performance: a systematic review and meta-analysis. *Res Sport Med* 27:238–256. <https://doi.org/10.1080/15438627.2018.1552146>
 5. Souza DB, Del Coso J, Casonatto J, Polito MD (2017) Acute effects of caffeine-containing energy drinks on physical performance: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr* 56:13–27. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1331-9>
 6. Grgic J, Grgic I, Pickering C et al (2019) Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance—an umbrella review of 21 published meta-analyses. *Br J Sports Med*. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-100278>
 7. Cappelletti S, Daria P, Sani G et al (2015) Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Curr Neuropharmacol* 13:71–88. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666141210215655>
 8. Mahoney CR, Giles GE, Marriott BP et al (2019) Intake of caffeine from all sources and reasons for use by college students. *Clin Nutr* 38:668–675. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.04.004>
 9. Grosso G, Godos J, Galvano F, Giovannucci EL (2017) Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review. *Annu Rev Nutr* 37:131–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064941>
 10. Wikoff D, Welsh BT, Henderson R et al (2017) Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food Chem Toxicol* 109:585–648. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.002>
 11. Guessous I, Eap CB, Bochud M (2014) Blood pressure in relation to coffee and caffeine consumption. *Curr Hypertens Rep* 16:468. <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0468-2>
 12. Zhang Z, Hu G, Caballero B et al (2011) Habitual coffee consumption and risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Am J Clin Nutr* 93:1212–1219. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004044>
 13. Robertson D, Wade D, Workman R et al (1981) Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. *J Clin Invest* 67:1111–1117
 14. Bell DG, McLellan TM (2002) Exercise endurance 1, 3, and 6 h after caffeine ingestion in caffeine users and nonusers. *J Appl Physiol* 93:1227–1234. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00187.2002>
 15. Corti R, Binggeli C, Sudano I et al (2002) Coffee acutely increases sympathetic nerve activity and blood pressure independently of caffeine content: role of habitual versus nonhabitual drinking. *Circulation* 106:2935–2940
 16. Vera J, Redondo B, Molina R et al (2019) Effects of caffeine on intraocular pressure are subject to tolerance: a comparative study between low and high caffeine consumers. *Psychopharmacology* 236:811–819. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5114-2>
 17. Watson J, Deary I, Kerr D (2002) Central and peripheral effects of sustained caffeine use: tolerance is incomplete. *Br J Clin Pharmacol* 54:400–406. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2002.01681.x>
 18. Childs E, de Wit H (2006) Subjective, behavioral, and physiological effects of acute caffeine in light, nondependent caffeine users. *Psychopharmacology* 185:514–523. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0341-3>
 19. de Gonçalves LS, de Painelli VS, Yamaguchi G et al (2017) Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation. *J Appl Physiol* 123:213–220. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00260.2017>
 20. Kennedy DO, Haskell CF (2011) Cerebral blood flow and behavioural effects of caffeine in habitual and non-habitual consumers of caffeine: a near infrared spectroscopy study. *Biol Psychol* 86:298–306. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.12.010>
 21. Fredholm BB, Yang J, Wang Y (2017) Low, but not high, dose caffeine is a readily available probe for adenosine actions. *Mol Aspects Med* 55:20–25. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.011>
 22. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J et al (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51:83–133
 23. Shi D, Nikodijević O, Jacobson KA, Daly JW (1993) Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell Mol Neurobiol* 13:247–261. <https://doi.org/10.1007/BF00733753>
 24. Bühler E, Lachenmeier DW, Schlegel K, Winkler G (2014) Development of a tool to assess the caffeine intake among teenagers and young adults. *Ernährungs Umschau* 61:58–63
 25. Beevers G, Lip GY, O'Brien E (2001) ABC of hypertension: blood pressure measurement. *BMJ* 322:981–985. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7292.981>
 26. Lara B, Ruiz-Moreno C, Salinero JJ, Del Coso J (2019) Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. *PLoS ONE* 14:e0210275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210275>
 27. Hopkins WG, Marshall SW, Batterham AM, Hanin J (2009) Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Med Sci Sports Exerc* 41:3–13
 28. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS et al (2016) Heart disease and stroke statistics—2016 update. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000350>
 29. Echeverri D, Montes FR, Cabrera M et al (2010) Caffeine's vascular mechanisms of action. *Int J Vasc Med* 2010:834060. <https://doi.org/10.1155/2010/834060>
 30. Nehlig A, Daval JL, Debry G (1992) Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* 17:139–170
 31. Davis JM, Zhao Z, Stock HS et al (2003) Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 284:R399–R404. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00386.2002>
 32. Elmenhorst D, Meyer PT, Matusch A et al (2012) Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET. *J Nucl Med* 53:1723–1729. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.105114>
 33. European Food Safety Authority (2015) Why did EFSA carry out its risk assessment? www.efsa.europa.eu. Accessed 3 Dec 2019
 34. Anker D, Santos-Eggimann B, Santschi V et al (2018) Screening and treatment of hypertension in older adults: less is more? *Public Health Rev* 39:26

ANEXO ARTÍCULO 6

Challenging the myth of non-response to the ergogenic effects of caffeine ingestion on exercise performance.

Communication

Challenging the Myth of Non-Response to the Ergogenic Effects of Caffeine Ingestion on Exercise Performance

Juan Del Coso ^{*}, Beatriz Lara, Carlos Ruiz-Moreno  and Juan José Salinero 

Exercise Physiology Laboratory, Camilo José Cela University, 28692 Madrid, Spain; blara@ucjc.edu (B.L.); cruizm@ucjc.edu (C.R.-M.); jjsalinero@ucjc.edu (J.J.S.)

* Correspondence: jdelcoso@ucjc.edu; Tel.: +34-918-153-131

Received: 7 March 2019; Accepted: 27 March 2019; Published: 29 March 2019



Abstract: The ergogenicity of caffeine on several exercise and sport situations is well-established. However, the extent of the ergogenic response to acute caffeine ingestion might greatly vary among individuals despite using the same dosage and timing. The existence of one or several individuals that obtained minimal ergogenic effects or even slightly ergolytic effects after caffeine intake (i.e., non-responders) has been reported in several previous investigations. Nevertheless, the concept non-responding to caffeine, in terms of physical performance, relies on investigations based on the measurement of one performance variable obtained once. Recently it has been suggested that correct identification of the individual ergogenic effect induced by caffeine intake requires the repeated measurement of physical performance in identical caffeine–placebo comparisons. In this communication, we present data from an investigation where the ergogenic effect of acute caffeine intake (3 mg/kg) was measured eight times over a placebo in the same individuals and under the same conditions by an incremental cycling test to volitional fatigue and an adapted version of the Wingate cycling test. The ergogenic response to caffeine varied from 9% to 1% among individuals, but all participants increased both cycling power in the incremental test and Wingate mean power at least three to eight times out of eight the caffeine–placebo comparisons. These data expand the suggestion of a minimal occurrence of caffeine non-responders because it shows that all individuals responded to caffeine when caffeine is compared to a placebo on multiple and repeated testing sessions.

Keywords: individual responses; responders; exercise performance; ergogenic aids

1. Introduction

2018 has been a prolific year for the publication of manuscripts aimed at explaining the causes of the interindividual variations for the ergogenic response of caffeine ingestion on exercise performance. Particularly, we read with interest the reviews by Southward et al. [1] and Fulton et al. [2] and the letter by Grgic [3], published in *Nutrients* in 2018, because they offered new insights towards unveiling the causes of the variability on physiological responses to caffeine. With this communication, we want to expand the understanding about why some individuals obtain less ergogenic benefits after the ingestion of a moderate dose of caffeine than others, and perhaps it will help to dispel the myth/concept of non-responders to caffeine, at least when referring to exercise performance.

2. Individual Responses to Ergogenic Effects of Caffeine Ingestion

The utility of caffeine to increase physical performance in several exercise and sport situations is well-established and has been recently confirmed by systematic reviews and meta-analyses [4–7]. In addition, the use of caffeine or caffeinated products before competition is high, especially in individual

sports or athletes of sports with an aerobic-like nature [8]. However, a small number of investigations have shown that the extent of the ergogenic response(s) to acute caffeine ingestion might greatly vary among individuals ([9–11] and the analysis of several investigations in [3]). These latter investigations have used cross-over and randomized experimental designs where the intake of a moderate dose of caffeine (1–6 mg/kg) is compared to a placebo condition in a group of individuals. Interestingly, these investigations indicated that, despite caffeine having produced an increase in physical performance as a group mean, one or several individuals obtained minimal ergogenic effects or even slightly ergolytic effects after caffeine intake despite being under the same experimental protocol. These individuals are frequently categorized as non-responders to the ergogenic effects of caffeine [12] and the causes for the lack of a positive physical response to caffeine have been associated to genetic (CYP1A2 and ADORA2A polymorphisms) and environmental factors, such as tolerance developed by chronic caffeine use and inappropriate timing and dose of administration or training status [13,14].

3. The Concept of Non-Responding to Caffeine Based on One Caffeine–Placebo Comparison

Recently, Pickering and Kiely [13] and Grgic [3] have criticized the concept non-responding to caffeine, in terms of physical performance, because this notion mostly relies on investigations based on the measurement of one performance variable obtained once. This experimental methodology to assess individual responses to caffeine ingestion might produce erroneous inferences because an individual does not always respond to caffeine to the same extent in all forms of exercise testing [9,15]. In addition, the reliability of the exercise test also needs to be considered when extrapolating conclusions regarding possible non-responses to the performance-enhancing effects of acute caffeine intake [3]. In fact, investigations where the ergogenic response to caffeine was explored by using the results of more than one physical performance test have shown that one participant might be categorized as a responder and a non-responder to caffeine at the same time due to his/her different outcomes in the different performance tests [9,15]. Pickering and Kiely [13] and Grgic [3] concur in suggesting that correct identification of the individual ergogenic effect induced by caffeine intake requires the repeated measurement of physical performance in identical caffeine–placebo comparisons. As suggested by Grgic [3], one of the following options can be selected to assess the individual ergogenic effect induced by caffeine: (1) multiple exercise tests with the same dose of caffeine or, (2) multiple doses of caffeine with the same exercise test, or (3) using a more complex protocol that combines repeated assessments of physical performance on different days using the same exercise test and dose of caffeine. If this is the case, most of the previous investigations on the study of individual responses to ergogenic effects of caffeine might not be methodologically correct because the categorization has been mainly based on one caffeine–placebo comparison.

4. Repeated Testing of the Ergogenic Effect of Caffeine Ingestion Measured on Two Exercise Tests

We have recently published an investigation where the ergogenic effect of caffeine (3 mg/kg) was measured eight times over a placebo in the same individuals by using two physical performance tests: an incremental cycling test to volitional fatigue (25 W/minutes) and an adapted version of the Wingate cycling test [16]. The performance measurements were accompanied by the measurement of resting blood pressure, in addition to other physiological variables. The investigation was aimed at determining the time course of tolerance to the performance benefits of caffeine, and 11 participants ingested 3 mg/kg/day of caffeine, or a placebo, for 20 consecutive days. It is important to indicate that all participants were light caffeine consumers and refrained from all sources of dietary caffeine for the month before the onset of the experiment to eliminate the effect of habituation to caffeine (which represents another possible source of error when assessing individual responses). The caffeine–placebo comparisons were made after 1, 4, 6, 8, 13, 15, 18, and 20 days of consecutive caffeine or placebo ingestion while the order of the 20-day treatments was randomized. The coefficient of variation of the exercise tests and of the arterial blood pressure measurement were calculated by using the values

obtained in the 20-day placebo treatment. A complete description of methods and standardizations can be found in the publication of this experiment [16].

Because the tolerance to the ergogenic effect of caffeine was not completed after 20 days of consecutive ingestion, we have performed a sub-analysis for this communication to present the individual responses to acute caffeine intake in each of the eight identical caffeine–placebo comparisons. Figure 1 presents individual box-and-whisker plots for changes induced by caffeine intake, over the ingestion of a placebo, on cycling power obtained during the incremental test (W_{max}) and mean cycling power obtained during the 15-second Wingate test. Figure 1 is a clear example of the interindividual variability in response to caffeine ingestion, with diverse caffeine-induced ergogenicity observed among individuals. Figure 1 has been organized in a ergogenicity-decrescent manner from left to right, with the participant showing the highest response to the ergogenic effects of caffeine at the left (subject 1 = $9.0 \pm 3.6\%$ and $2.3 \pm 1.4\%$ for W_{max} and Wingate cycling power, respectively) and the individual with the lowest response at the right (subject 11 = $0.6 \pm 6.3\%$ and $1.6 \pm 4.2\%$ for W_{max} and Wingate cycling power, respectively). Furthermore, Figure 1 also shows the intraindividual variability for the ergogenic effects of caffeine on both exercise performance tests. This figure disputes the notion of non-responding to the ergogenic effect of caffeine because all of the 11 included participants improved performance following caffeine ingestion, in either the graded exercise test or the Wingate test, in at least three testing occasions (with the magnitude of improvements exceeding the coefficient of variation for each test). These data expand the suggestion of a minimal occurrence of non-responders [3] because it shows that all individuals responded to caffeine, to an extent above the random error of the performance tests, when a repeated caffeine–placebo testing protocol was used to assess individual responses to caffeine. Thus, in the opinion of the authors of this manuscript, the concept of non-responders to the ergogenic effects of caffeine should be revisited.

Figure 2 offers further insights on this topic because it presents individual data on caffeine-induced changes on resting systolic and diastolic blood pressure, measured before exercise, which is a variable also employed to categorize individual responses to acute caffeine ingestion [17]. As it happens with the ergogenic effect of caffeine, the outcomes of caffeine on blood pressure had great inter- and intraindividual variability. However, the participants with the highest responses to the cardiovascular effects of caffeine were the ones with the lowest response to the ergogenic effects of caffeine (with the exception of subject 5). To further explore this relationship, Figure 3 associates ergogenic and cardiovascular responses to caffeine ingestion. Interestingly, changes induced by caffeine intake in both systolic and diastolic blood pressures were negatively related to caffeine ergogenicity in both cycling performance tests. Briefly, this would mean that the individual with a high response to the cardiovascular effects of caffeine would be less prone to obtain ergogenic benefits from this substance. Although the mechanism behind this association is not evident from the current analysis, the association between high cardiovascular response to caffeine and decreased performance effects of caffeine has support in the literature. Wardle et al. [18] found that high cardiovascular responders to a 200-mg dose of caffeine decreased their willingness to exert an effort, a negative outcome that was not present in low cardiovascular responders to caffeine. This information might suggest that the cardiovascular and performance effects of caffeine might be incompatible and implies that high and low responders to the ergogenic effect of caffeine may exhibit divergent blood pressure response following acute caffeine ingestion. However, given the overall low sample number of the current study, this is an area that merits future research. If we can pinpoint that simple measurements such as blood pressure responses to caffeine ingestion are related to the magnitude of improvements in performance, this information may be of considerable practical importance for coaches and athletes when determining an optimal approach to caffeine supplementation.

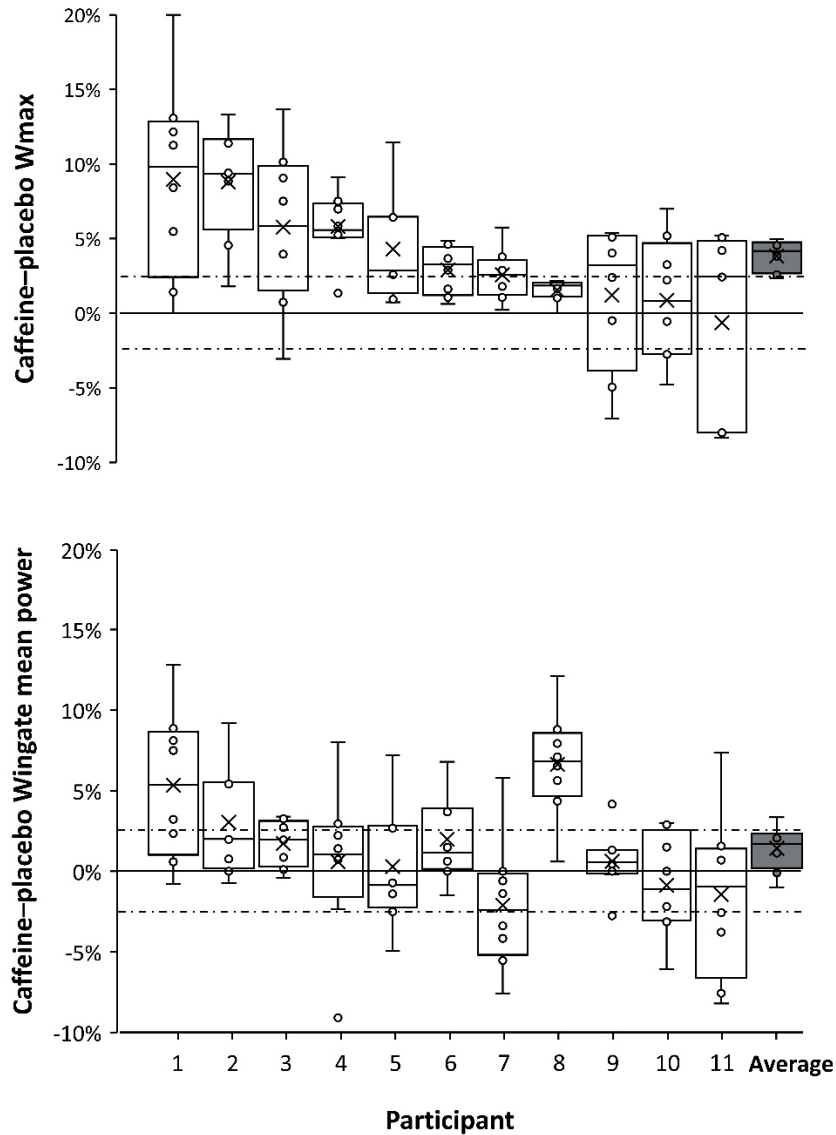


Figure 1. Box-and-whisker plots for the ergogenic effects of 3 mg/kg of caffeine on cycling power during a graded exercise test (upper panel) and during a 15-second Wingate test (lower panel). Caffeine was compared to a placebo on eight different occasions and each plot represents the results of these eight caffeine–placebo comparisons for each participant. “Average” represents the mean values for all 11 participants. The cross depicts the mean value for each individual while the lower, middle, and upper lines of the box represent the 25%, 50%, and 75% percentile for each individual. Whiskers represent the lowest and highest values (range). The black dashed line represents the natural variation of the graded exercise test ($\pm 2.4\%$) and the 15-second Wingate test ($\pm 2.7\%$) measured during the placebo treatment.

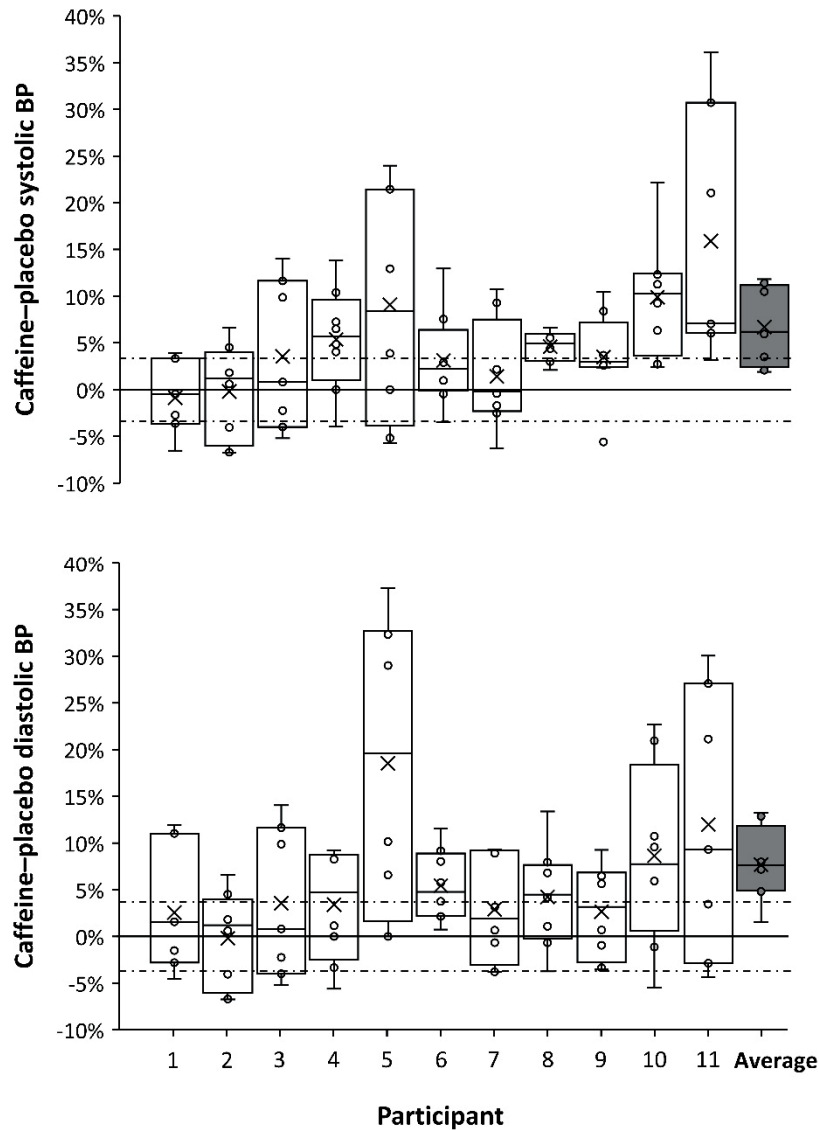


Figure 2. Box-and-whisker plots for the effects of 3 mg/kg of caffeine on resting systolic (upper panel) and diastolic (lower panel) blood pressure (BP). Caffeine was compared to a placebo on eight different occasions and each plot represents the results of these eight caffeine–placebo comparisons for each participant. “Average” represents the mean values for all 11 participants. The cross depicts the mean value for each individual while the lower, middle, and upper lines of the box represent the 25%, 50%, and 75% percentile for each individual. Whiskers represent the lowest and highest values (range). The black dashed line represents the natural variation of the systolic ($\pm 3.3\%$) and diastolic blood pressure ($\pm 3.8\%$) measured during the placebo treatment.

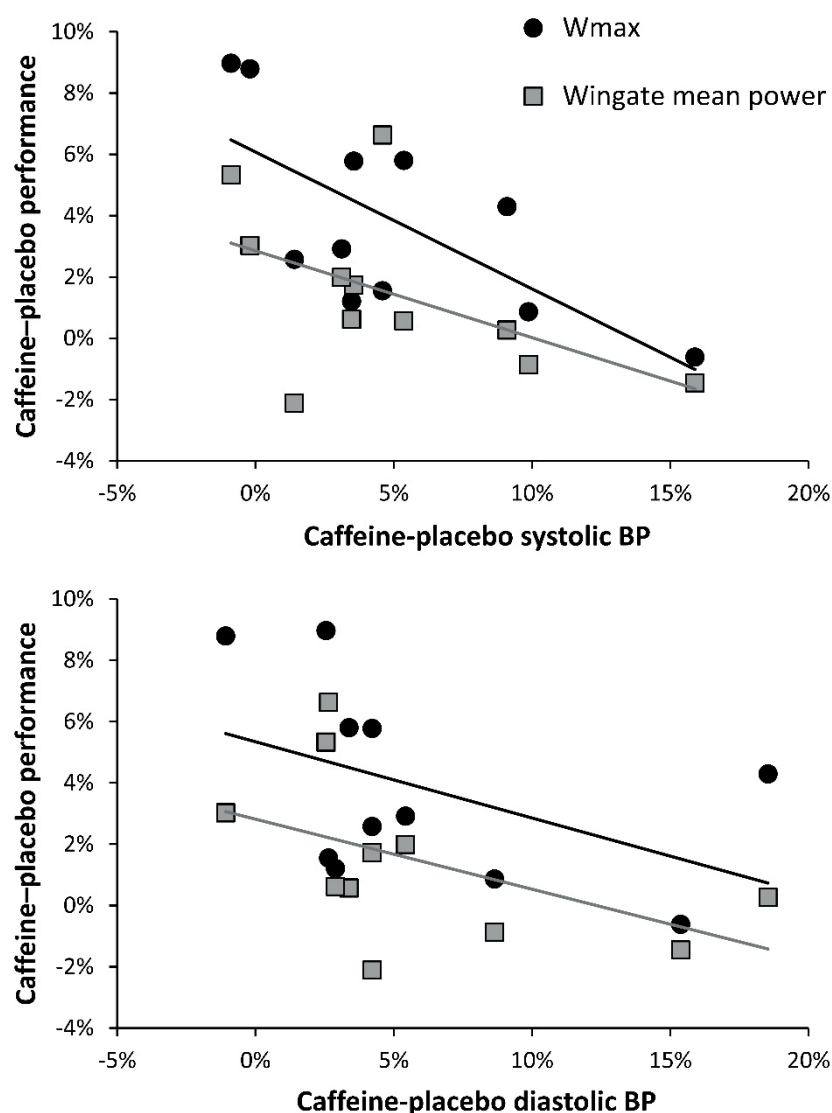


Figure 3. Relationships between the ergogenic effect of caffeine and systolic (upper panel) and diastolic (lower panel) blood pressure (BP). The ergogenic effect of caffeine was obtained by measuring peak cycling power during a graded exercise test (Wmax) and during a 15-second Wingate test. Caffeine was compared to a placebo on eight different occasions and each dot represents an average of these eight caffeine–placebo comparisons for each participant.

5. Conclusions

In conclusion, the data provided in this communication do not dispute the existence of a great interindividual variability to the ergogenic effects of caffeine ingestion, nor the genetic, environmental, or epigenetic causes associated to this variability. However, this analysis suggests that all individuals, to some extent, positively respond to the acute ingestion of 3 mg/kg of caffeine, while the magnitude of the ergogenic effect might be the result of the totality of consequences induced by caffeine ingestion on the human body. In this respect, this communication suggests that the individuals with a high response to the cardiovascular effects of caffeine would be less prone to obtaining ergogenic benefits from this stimulant. Caffeine ergogenicity might be subject to genetic influence, but future investigations on this topic should assess the individual ergogenic response to caffeine by using different forms of exercise testing and/or by using well-standardized caffeine–placebo comparisons on multiple, repeated testing sessions. In the point of view of the authors, this repeated measurement of the

ergogenic effect of caffeine would help to reduce the equivocal findings of previous investigations on genetic variations [2]. From a practical perspective, the adjustment of appropriate dosage, timing, and form of administration of caffeine for an athlete might require several examinations in which physical performance and side-effects of caffeine should be measured and registered over a control situation. Gathering conclusions about the ergogenic effect of caffeine in one individual solely based on the results from one performance test might induce erroneous conclusions in both scientific and sport settings. The use of multiple, repeated comparisons between a potentially active substance vs. a placebo might also be recommended when investigating the individual ergogenic responses to other ergogenic substances/supplements.

Author Contributions: Conceptualization: J.D.C., B.L., C.R.-M., and J.J.S.; methodology: J.D.C., B.L., C.R.-M., and J.J.S.; writing—original draft preparation: J.D.C.; writing—review and editing: B.L., C.R.-M., and J.J.S.; supervision: J.D.C.; project administration: J.D.C.

Funding: This investigation did not receive any funding.

Acknowledgments: The authors of this investigation want to acknowledge the effort of all the laboratory personnel of the Doping Control Laboratory in Madrid that participated in the measurement of the urine samples that made this investigation possible.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Southward, K.; Rutherford-Markwick, K.; Badenhorst, C.; Ali, A. The Role of Genetics in Moderating the Inter-Individual Differences in the Ergogenicity of Caffeine. *Nutrients* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fulton, J.L.; Dinas, P.C.; Carrillo, A.E.; Edsall, J.R.; Ryan, E.J. Impact of Genetic Variability on Physiological Responses to Caffeine in Humans: A Systematic Review. *Nutrients* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Grgic, J. Are There Non-Responders to the Ergogenic Effects of Caffeine Ingestion on Exercise Performance? *Nutrients* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Salinero, J.J.; Lara, B.; Del Coso, J. Effects of acute ingestion of caffeine on team sports performance: A systematic review and meta-analysis. *Res. Sports Med.* **2018**, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Souza, D.B.; Del Coso, J.; Casonatto, J.; Polito, M.D. Acute effects of caffeine-containing energy drinks on physical performance: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 13–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Southward, K.; Rutherford-Markwick, K.J.; Ali, A. The Effect of Acute Caffeine Ingestion on Endurance Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* **2018**, *48*, 1913–1928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Grgic, J.; Trexler, E.T.; Lazinica, B.; Pedisic, Z. Effects of caffeine intake on muscle strength and power: A systematic review and meta-analysis. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2018**, *15*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Aguilar-Navarro, M.; Munoz, G.; Salinero, J.J.; Munoz-Guerra, J.; Fernandez-Alvarez, M.; Plata, M.D.M.; Del Coso, J. Urine Caffeine Concentration in Doping Control Samples from 2004 to 2015. *Nutrients* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lara, B.; Ruiz-Vicente, D.; Areces, F.; Abian-Vicen, J.; Salinero, J.J.; Gonzalez-Millan, C.; Gallo-Salazar, C.; Del Coso, J. Acute consumption of a caffeinated energy drink enhances aspects of performance in sprint swimmers. *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 908–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Jenkins, N.T.; Trilk, J.L.; Singhal, A.; O'Connor, P.J.; Cureton, K.J. Ergogenic effects of low doses of caffeine on cycling performance. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* **2008**, *18*, 328–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Puente, C.; Abian-Vicen, J.; Del Coso, J.; Lara, B.; Salinero, J.J. The CYP1A2 -163C>A polymorphism does not alter the effects of caffeine on basketball performance. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Salinero, J.J.; Lara, B.; Ruiz-Vicente, D.; Areces, F.; Puente-Torres, C.; Gallo-Salazar, C.; Pascual, T.; Del Coso, J. CYP1A2 Genotype Variations Do Not Modify the Benefits and Drawbacks of Caffeine during Exercise: A Pilot Study. *Nutrients* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pickering, C.; Kiely, J. Are the Current Guidelines on Caffeine Use in Sport Optimal for Everyone? Inter-individual Variation in Caffeine Ergogenicity, and a Move Towards Personalised Sports Nutrition. *Sports Med.* **2018**, *48*, 7–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Pickering, C. Caffeine, CYP1A2 genotype, and sports performance: is timing important? *Ir. J. Med. Sci.* **2018**. [[CrossRef](#)]
15. Grgic, J.; Mikulic, P. Caffeine ingestion acutely enhances muscular strength and power but not muscular endurance in resistance-trained men. *Eur. J. Sport Sci.* **2017**, *17*, 1029–1036. [[CrossRef](#)]
16. Lara, B.; Ruiz-Moreno, C.; Salinero, J.J.; Del Coso, J. Time course of tolerance to the performance benefits of caffeine. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210275. [[CrossRef](#)]
17. Apostolidis, A.; Mougios, V.; Smilios, I.; Rodosthenous, J.; Hadjicharalambous, M. Caffeine Supplementation: Ergogenic in Both High and Low Caffeine Responders. *Int. J. Sports Physiol. Perform.* **2018**, 1–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wardle, M.C.; Treadway, M.T.; de Wit, H. Caffeine increases psychomotor performance on the effort expenditure for rewards task. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2012**, *102*, 526–531. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

HOJA DE DATOS

HOJA DE DATOS

SUJETO:

FECHA:

Temperatura:

Humedad:

Tensión arterial:

Altura sillín:

Cadencia media:

*si las dos medidas primeras son iguales no se realiza la tercera.

F.C reposo:

Sillín:

Rpm:

Máscara:

Wattios	Minuto de inicio	Minuto de fin	F.C (entre el seg.40 y 50)
Calentamiento			
50			
75			
100			
125			
150			
175			
200			
225			
250			
275			
300			
325			
350			
(al final)			
Observaciones:			

NOMBRE:

PRUEBA: A/B

HORA DE INGESTA:

TEMPERATURA:

HUMEDAD:

TENSION ARTERIAL:

FAT MAX:

FECHA:

HIDRATACION:

SISTOLICA	DIASTOLICA	FC

MINUTOS ANALIZADOR	MINUTOS DE MEDICION	FRECUENCIA CARDIACA	VO ₂	R	ESCALA DE BORG
	4-5				
	9-10				
	14-15				
	19-20				
	24-25				
	29-30				
	34-35				
	39-40				
	44-45				
	49-50				
	54-55				
	59-60				

HOJA DE DATOS VO₂MÁX PRUEBAS DEL CICLO

SUJETO:

FECHA:

CICLO:

Hora de Ingesta:

Temperatura:

Humedad:

Cadencia:

HORA DE INICIO INCREMENTAL __/__/__ HORA FINAL INCREMENTAL __/__/__

HORA DE INICIO WINGATE __/__/__

Rpm:

Máscara:

Wattios	Minuto de inicio	Minuto de fin	F.C (entre el seg.40 y 50)	Saturación izquierda	Saturación derecha
Calentamiento					
50					
75					
100					
125					
150					
175					
200					
225					
250					
275					
300					
325					
350					
Escala de Borg (al final)					
Observaciones:					

Lactato	(pasado 1')
----------------	-------------

Wingate (15')	Potencia Máxima	Escala de Borg al comenzar	Escala de Borg al finalizar	Lactato

Valora del **1 al 10**, siendo **1 poco o nada** y **10 mucho**:

Valora tu percepción de fuerza/velocidad de la prueba WINGATE:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Valora tu percepción de resistencia durante la prueba incremental:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Valora tu percepción de fatiga durante la prueba incremental:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

¿Te han gustado/servido los efectos que has sentido?

¿Has tomado algún medicamento por algún motivo?

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBA DE RENDIMIENTO

NOMBRE Y APELLIDOS _____

DNI _____

Usted va a realizar una prueba de ejercicio sobre un cicloergómetro. La intensidad del ejercicio va a comenzar baja y se aumentara la carga en periodos de tiempo iguales hasta que se obtenga su máximo esfuerzo. Durante la prueba se le solicitará que respire a través de una careta o boquilla para analizar su consumo de oxígeno. Este procedimiento no le impedirá respirar normalmente el aire de la sala. Al finalizar la prueba se le extraerá una pequeña muestra de sangre por medio de punción en el pulpejo del dedo. Durante estas extracciones se seguirán procedimientos con la mayor asepsia posible para evitar la infección de las punciones. Además se le monitorizará la frecuencia cardiaca a través de una banda elástica fijada a su pecho.

El grupo de investigadores podemos parar la prueba en cualquier momento si observamos en usted signos de fatiga anormales, cambios repentinos en su frecuencia cardiaca, presión sanguínea, u otros síntomas que usted pueda experimentar (mareos, descoordinación). Es importante que sepa que puede suspender la prueba en cualquier momento por sentir fatiga u otras molestias que no fuesen obvias para nosotros.

Existe la posibilidad que ocurran anormalidades en la tensión arterial, alteración en el ritmo cardiaco o en raras ocasiones, fibrilación o parada cardio-respiratoria. Todos nuestros esfuerzos estarán encaminados a minimizar estos riesgos y se tendrá una observación cuidadosa durante la prueba. En caso de que se de una situación de emergencia de este tipo se le brindarán los primeros auxilios y se le trasladaría con la mayor celeridad al hospital más cercano.

La información que usted nos oculte o nos de inadecuadamente acerca de experiencias previas de síntomas relacionados con su sistema cardiorespiratorio (semejantes a dificultad respiratoria con bajo nivel de actividad física, dolor o sensación de opresión en el pecho, cuello, mandíbula, espalda o brazos) en relación a esfuerzos físicos puede afectar la seguridad de su prueba de rendimiento en forma negativa. La información acerca de cualquiera de estos síntomas durante la práctica del ejercicio es de vital importancia y debería de comunicárnoslo ahora mismo.

Igualmente debe usted decirnos los medicamentos que este tomando en los últimos días y especialmente los tomados el mismo día de la prueba.

Cualquier pregunta o duda que tenga usted acerca de la prueba, por favor debe hacérsela saber y se la resolveremos.

La información fruto de esta prueba de rendimiento será confidencial y no será revelada a ninguna persona, excepto a su médico y/o entrenador. Sin embargo, esta información puede ser usada para análisis estadísticos y propósitos científicos.

CONSENTIMIENTO:

Es así que acepto voluntariamente realizar la prueba de rendimiento para determinar el nivel de capacidad física y rendimiento deportivo. Entiendo que puedo parar la prueba en cualquier momento si así lo decidiese. Se me ha ofrecido una copia de esta hoja para quedármela si lo deseo.

He leído y entendido los procedimientos de la prueba de rendimiento y el riesgo que puede conllevar la misma y he tenido una respuesta satisfactoria a mis preguntas acerca de la misma.

Consiento pues la prueba de rendimiento realizada en _____

Fecha:

Firma del sujeto a estudio o su padre o tutor:

Fecha:

Firma del testigo:

Título del Proyecto: Efectos de la ingesta prolongada de cafeína sobre el rendimiento aeróbico y anaeróbico.

D./Dña , con fecha de nacimiento: y con DNI nº , manifiesta que ha sido convenientemente informado por el investigador responsable del proyecto, el Dr. Beatriz Lara López, quien le ha explicado las actividades que se van a realizar y ha resuelto todas sus dudas por lo que afirma que es conocedor de lo que su participación supone, incluyendo todos los beneficios y riesgos que podría suponer su participación en este estudio, que son los siguientes:

El beneficio derivado de tu participación será:

- A nivel individual: La posibilidad de obtener información sobre tu rendimiento deportivo con la ingesta de cafeína en un largo periodo de tiempo, pudiendo tener, por tanto, si así lo solicitas, tus resultados de las diferentes pruebas realizadas.
- A nivel social: La obtención de información muy útil para establecer el efecto que tiene la cafeína de manera prolongada en el rendimiento deportivo, en las diferentes modalidades que vamos a estudiar.

Los riesgos derivados de tu participación se limitan a:

- Posibilidad de lesión en la realización de las pruebas, por algún accidente que pudiese acontecer en la realización de las mismas. En cualquier caso, el riesgo de lesión no será mayor al de otros entrenamientos. Los investigadores minimizarán el riesgo de lesión estableciendo un calentamiento estandarizado con una parte específica.
- Existe también el riesgo de que la cafeína te genere cierta intolerancia tras su consumo.

Afirma, igualmente que ha sido también informado de que sus datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

Por ello, su firma en el presente documento significa que participa voluntariamente en los procedimientos experimentales explicados en la hoja informativa y que OTORGA su CONSENTIMIENTO para el uso de sus datos y muestras obtenidas, con el único fin de cubrir los objetivos especificados del presente estudio.

Madrid a dedel.....

Fdo.

Título del Proyecto: Efectos de la ingesta de cafeína en la saturación de oxígeno en una prueba incremental de esfuerzo y un Wingate.

D./Dña , con fecha de nacimiento: y con DNI nº , manifiesta que ha sido convenientemente informado por el investigador responsable del proyecto, Carlos Ruiz Moreno, quien le ha explicado las actividades que se van a realizar y ha resuelto todas sus dudas por lo que afirma que es conocedor de lo que su participación supone, incluyendo todos los beneficios y riesgos que podría suponer su participación en este estudio, que son los siguientes:

El beneficio derivado de tu participación será:

- A nivel individual: La posibilidad de obtener información sobre tu rendimiento deportivo con la ingesta de cafeína, pudiendo tener, por tanto, si así lo solicitas, tus resultados de las diferentes pruebas realizadas.
- A nivel social: La obtención de información muy útil para establecer el efecto que tiene la cafeína de incidiendo en la saturación de oxígeno como variable de tu rendimiento deportivo, en las diferentes modalidades que vamos a estudiar.

Los riesgos derivados de tu participación se limitan a:

- Posibilidad de lesión en la realización de las pruebas, por algún accidente que pudiese acontecer en la realización de las mismas. En cualquier caso, el riesgo de lesión no será mayor al de otros entrenamientos. Los investigadores minimizarán el riesgo de lesión estableciendo un calentamiento estandarizado con una parte específica.
- Existe también el riesgo de que la cafeína te genere cierta intolerancia tras su consumo.

Afirma, igualmente que ha sido también informado de que sus datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

Por ello, su firma en el presente documento significa que participa voluntariamente en los procedimientos experimentales explicados en la hoja informativa y que OTORGA su CONSENTIMIENTO para el uso de sus datos y muestras obtenidas, con el único fin de cubrir los objetivos especificados del presente estudio.

Madrid a dedel.....

Fdo.

Título del Proyecto: Efectos de una ingesta aguda de la cafeína en el rendimiento de la oxidación de grasas.

D./Dña , con fecha de nacimiento: y con DNI nº , manifiesta que ha sido convenientemente informado por el investigador responsable del proyecto, Carlos Ruiz Moreno, quien le ha explicado las actividades que se van a realizar y ha resuelto todas sus dudas por lo que afirma que es conocedor de lo que su participación supone, incluyendo todos los beneficios y riesgos que podría suponer su participación en este estudio, que son los siguientes:

El beneficio derivado de tu participación será:

- A nivel individual: La posibilidad de obtener información sobre tu rendimiento deportivo con la ingesta de cafeína, pudiendo tener, por tanto, si así lo solicitas, tus resultados de las diferentes pruebas realizadas.
- A nivel social: La obtención de información muy útil para establecer el efecto que tiene la cafeína de incidiendo en la saturación de oxígeno como variable de tu rendimiento deportivo, en las diferentes modalidades que vamos a estudiar.

Los riesgos derivados de tu participación se limitan a:

- Posibilidad de lesión en la realización de las pruebas, por algún accidente que pudiese acontecer en la realización de las mismas. En cualquier caso, el riesgo de lesión no será mayor al de otros entrenamientos. Los investigadores minimizarán el riesgo de lesión estableciendo un calentamiento estandarizado con una parte específica.
- Existe también el riesgo de que la cafeína te genere cierta intolerancia tras su consumo.

Afirma, igualmente que ha sido también informado de que sus datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

Por ello, su firma en el presente documento significa que participa voluntariamente en los procedimientos experimentales explicados en la hoja informativa y que OTORGA su CONSENTIMIENTO para el uso de sus datos y muestras obtenidas, con el único fin de cubrir los objetivos especificados del presente estudio.

Madrid a dedel.....

Fdo.

EXPOSICIONES EN CONGRESOS



VII Jornadas Nacionales de Medicina del Deporte
El ejercicio: de la prevención al tratamiento
Zaragoza 24 y 25 noviembre 2017

DON PEDRO MANONELLES MARQUETA, en su calidad de presidente del Comité Organizador de las VII JORNADAS NACIONALES DE MEDICINA DEL DEPORTE “EL EJERCICIO FÍSICO: DE LA PREVENCIÓN AL TRATAMIENTO”, desarrolladas en Zaragoza los días 24 y 25 de noviembre de 2017

CERTIFICA que:

D. Carlos Ruíz Moreno

ha participado en las mismas defendiendo la exposición:

TOLERANCIA A LOS EFECTOS ERGOGÉNICOS DE LA CAFEÍNA CON UNA INGESTA CONTINUADA

Lo que certifico a los efectos oportunos en Zaragoza a 03 de mayo de 2021.



Dr. Pedro Manonelles
*Presidente Comité Organizador
VII Jornadas Nacionales de Medicina del
Deporte*



**X CURSO DE MEDICINA Y
TRAUMATOLOGÍA DEL DEPORTE**
Medicina y Traumatología aplicada al
DEPORTISTA VETERANO

D. Carlos Ruiz Moreno

Ha asistido en calidad de **Asistente** al X Curso de Medicina y Traumatología del Deporte - Medicina y Traumatología aplicada al **DEPORTISTA VETERANO**, celebrado en Toledo los días 17 y 18 de febrero de 2017.

Dr. D. Fernando Jiménez Díaz
Director del Curso



Dr. Pedro Manonelles Marqueta
Presidente del Comité Científico

Monday, 03 May 2021

Confirmation of Presentation and Publication

To whom it may concern,

We hereby confirm that the abstract titled "CAFFEINE ERGOGENICITY IN MAXIMAL AEROBIC AND ANAEROBIC EXERCISE IS UNRELATED TO IMPROVED MUSCLE DEOXYGENATION" was accepted as a Mini-oral Presentation at the 23th annual Congress of the ECSS in Dublin, Ireland (4th - 7th of July 2018).

Authors:

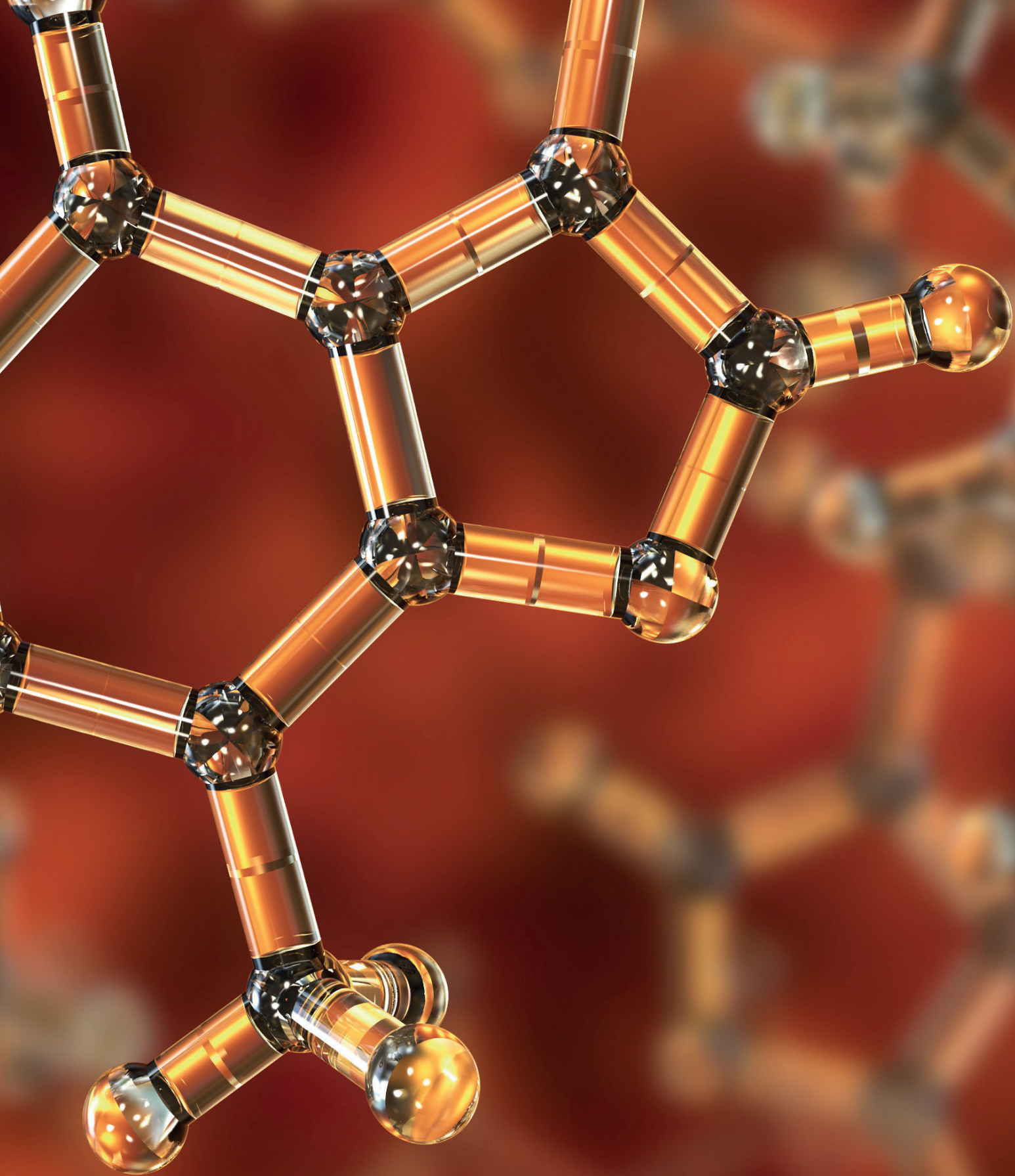
RUIZ-MORENO, C., GUTIERREZ-HELLÍN, J., CUÉLLAR-RAYO, A., LARA, B., DEL COSO, J.

The above-mentioned abstract was also published in the Book of Abstracts of the 23th annual Congress of the ECSS in Dublin, Ireland (4th - 7th of July 2018).

Yours sincerely,



Thomas Delaveaux
Executive Director



 **Universidad
Camilo José Cela**

MADRID 2021

