

Estudi preclínic de la relació entre la ingesta
d'una dieta rica en cacau i hesperidina sobre el
rendiment, l'exercici físic extenuant i la seva
resposta immunitària

Abril Gorgori González

Tutor: Francisco Pérez Cano

Títol: Estudi preclínic de la relació entre la ingesta d'una dieta rica en cacau i hesperidina sobre el rendiment, l'exercici físic extenuant i la seva resposta immunitària

Resum: La pràctica d'exercici físic extenuant produeix alteracions fisiològiques tant a nivell cel·lular, amb un augment de la concentració d'espècies reactives d'oxigen, com a nivell sistèmic, produint canvis en la resposta immunitària; que es podrien atenuar amb la ingesta de flavonoides. L'objectiu d'aquest treball és avaluar l'efecte de dietes riques en flavonoides del cacau i la pròpia hesperidina, sobre el rendiment i la immunosupressió induïda per l'exercici extenuant. Aquest efecte s'ha avaluat amb rates Lewis que es van entrenar durant sis setmanes i que van consumir una dieta rica en cacau o una dieta rica en cacau i hesperidina. El cacau provoca una disminució de l'increment de pes corporal en animals sedentaris i corredors. No hi ha una millora del rendiment físic per efecte de cap de les dues dietes. En canvi, les dietes provoquen canvis en el pes de l'intestí, cec, melsa i timus, però no en el fetge ni el cor. La subpoblació leucocitària que presenta un major número de canvis, ja sigui per efecte de la dieta o de l'exercici, són els granulòcits. Amb les tres cohorts i les proves per avaluar la resposta immunitària, caldrà observar si els resultats presentats en aquest treball segueixen la mateixa tendència.

Title: Preclinical study of the relationship between the intake of a rich in cocoa and hesperidin diet over performance, exhausting training and its immune response

Abstract: Exhausting and intensive training leads to physiological changes in cells, such as a major concentration of oxygen reactive species, and in organic systems as the immune system. Flavonoids are compounds that are found in plants and they could attenuate these physiological changes. The aim of this project is to assess the impact of diets rich in flavonoids, mainly those found in cocoa and hesperidin, on performance and exercised-induced immunosuppression. This effect has been assessed in Lewis female rats trained for six weeks and with a cocoa or cocoa and hesperidin enriched diets. Cocoa decreases the body weight increase in sedentary and running animals. Neither of both diets improve physical performance. However, diets enriched in flavonoids change gut, caecum, thymus and spleen relative weights without changes in heart or liver weights. The leukocyte subpopulation which showed more changes, due to exercise and both diets, was granulocytes. Assessing immune response implicated cells in all the biological samples will determine if the results showed in this project are in accordance with them.

Paraules clau: cacau, hesperidina, immunosupressió, rendiment, extenuació

Key words: cocoa, hesperidin, immunosuppression, performance, exhaustion

ÍNDEX

1	Introducció	1
1.1	Flavonoides	1
1.1.1	Cacau	1
1.1.2	Hesperidina	2
1.2	Flavonoides i rendiment físic.....	2
1.3	Flavonoides i immunosupressió induïda per l'exercici	5
2	Objectius.....	6
3	Material i mètodes.....	6
3.1	Disseny experimental	6
3.2	Material biològic.....	7
3.3	Dietes i intervenció nutricional.....	8
3.4	Protocol d'exercici	8
3.4.1	Pauta d'exercici	9
3.4.2	Velocitat i rendiment.....	9
3.5	Obtenció i processament de mostres	10
3.5.1	Pes corporal i consum de pinso i aigua	10
3.5.2	Obtenció i processament de mostres biològiques	10
3.5.3	Variables sanguínies.....	11
3.5.4	Anàlisi estadística	11
4	Resultats.....	11
4.1	Rendiment.....	11
4.2	Increment de pes corporal	12
4.3	Eficiència energètica.....	13
4.4	Pes d'òrgans	14
4.5	Hemograma.....	15
5	Discussió	16
6	Conclusions	20
7	Bibliografia	21
8	Annexos.....	25
8.1	Annex I.....	25
8.2	Annex II.....	27
8.3	Bibliografia	31

1 Introducció

1.1 Flavonoides

Els polifenols són un conjunt de compostos bioactius que es troben a les plantes formant part del metabolisme secundari d'aquestes. Aquesta família de fitoquímics es classifica en diferents subclasses: els lignans, els àcids fenòlics, els estilbens com el resveratrol que es troba en la pell del raïm vermell i en el cacauet i, per últim, els flavonoides. Els flavonoides alhora es classifiquen en sis grups: flavonols, flavanols, flavanones, antocianines, flavones i isoflavones (1,2). La quercetina, el kaempferol i la miricetina són compostos de la subfamília dels flavonols i es troben en aliments com la ceba i el porro (3). Les antocianines són responsables del color característic de les fruites vermelles, destacant la cianidina i la delphinidina que es troben a la natura en la seva forma glicosilada (4). La naringenina, l'hesperidina i l'eriodictiol pertanyen a la subclasse de les flavanones i es troben en abundància en l'aranja, les taronges i la llimona, respectivament. El té verd i el cacau són les principals fonts de flavanols com la catequina i l'epicatequina (2). Les flavones inclouen l'apigenina i la luteolina i, tot i que no es troben àmpliament distribuïdes en els aliments, es troben altes quantitats en el julivert. Finalment, de les isoflavones destaquen la genisteïna i la daidzeïna presents a la soja (3). Així, les fruites i les verdures són grups d'aliments abundants en aquests compostos bioactius anomenats flavonoides (1). Patrons dietètics caracteritzats per un elevat consum d'aliments d'origen vegetals són fonamentals en la prevenció de malalties cròniques, i en aquest sentit, modulant el sistema immunitari i la resposta inflamatòria. Tot i això, els mecanismes pels quals actuen no estan del tot clars (5).

1.1.1 Cacau

El cacau és un aliment amb un elevat contingut de compostos bioactius que s'obté a partir del fruit de l'espècie *Theobroma cacao*. Els fitoquímics presents en aquesta llavor són principalment les metilxantines, representades per la teobromina; i els polifenols (6,7). D'entre els polifenols es troben àcids fenòlics com l'àcid ferúlic i el cafeïc, estilbens com el resveratrol i representants de l'àmplia família dels flavonoides. Si s'ordenen de major a menor presència, en el cacau hi ha: proantocianidines com la procianidina B2 i la C1; els flavonols, que són les unitats monomèriques de les proantocianidines, incloent (-)-epicatequina, (+)-catequina, (+)-gal·locatequina i (-)-epigal·locatequina; i en menor presència les antocianines (7). Les propietats immunomoduladores del cacau inclou el seu possible paper antiinflamatori demostrat en estudis in vitro i in vivo, mentre que en humans l'evidència és escassa. De fet, els efectes del cacau sobre el sistema immunitari, i els mecanismes implicats, com la regulació del fenotip limfocitari i de la capacitat de producció d'anticossos, s'han descrit només en animals d'experimentació com la rata (8). Aquesta possible capacitat immunomoduladora podria atribuir-se, entre d'altres, als flavonoides del cacau, promovent canvis en l'estatus

redox, que portaria a canvis en vies de senyalització cel·lular implicades en l'expressió de varis gens i consegüentment, en diverses funcions cel·lulars com la resposta immunitària (9).

1.1.2 Hesperidina

L'hesperidina és un glucòsid que es troba de manera natural en les fruites cítriques. És una única molècula, tret diferencial respecte el cacau que és una matriu alimentària, i forma part de les flavanones. Tot i que el suc de la taronja pot contenir entre 200 i 600 mg/L, es multiplica per cinc el seu contingut en les membranes que el contenen (2,10). Semblant al cacau, les propietats immunomoduladores de l'hesperidina s'han demostrat en models animals (10). Aquestes propietats s'exemplifiquen en els estudis que s'han dut a terme en el grup d'investigació on s'emmarca aquest treball, en els quals s'ha demostrat que millora la immunitat de les mucoses del tracte intestinal (11).

1.2 Flavonoides i rendiment físic

Durant la pràctica d'exercici físic es produeixen nombrosos canvis fisiològics tant a nivell cel·lular com sistèmic. Un d'ells és l'augment de la concentració d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen (RONS) com a conseqüència de la contracció del múscul esquelètic i cardíac. Aquest augment de les RONS provoca canvis en la senyalització cel·lular promovent l'expressió de gens antioxidants. Sovint, les defenses antioxidants endògenes no són suficients i és quan es genera un ambient pro-oxidant cel·lular que pot resultar en dany muscular (12). Tanmateix, les RONS són necessàries per a que hi hagi la contracció muscular, ja que en estudis in vitro s'ha demostrat que la contracció de les miofibril·les és inhibida quan la producció de RONS es suprimeix (13). L'estrès oxidatiu induït per l'exercici i el dany muscular associat són dos dels factors que modifiquen el rendiment dels esportistes. És per aquest motiu que els suplementes antioxidants, com són els flavonoides, s'han utilitzat com a possibles atenuadors d'aquest estrès oxidatiu (14).

A continuació es resumeixen els estudis pre-clínic i clínic que estudien l'efecte dels flavonoides sobre el rendiment. L'estratègia de cerca dels estudis pre-clínic inclosos en aquest treball s'explica en la **Figura 1a**.

En l'**Annex I** hi ha una taula que recull les principals característiques dels 27 estudis preclínic inclosos, que de manera més resumida es troben en la **Figura 2**. Les famílies de flavonoides més estudiades són els flavanols, sent les catequines del té verd els compostos principals, seguit dels flavonols, predominant la quercetina i la miricetina (**Figura 2a**). Aquests dos grups de flavonoides representen més de la meitat dels estudis realitzats. Les intervencions experimentals s'han portat a terme tant en ratolí com en rata en proporcions similars, utilitzant una dosi de flavonoide en la intervenció molt variable i, tot i que en la majoria de casos s'administrava de forma directa per sonda oral, en ocasions s'incorporava a la dieta experimental.

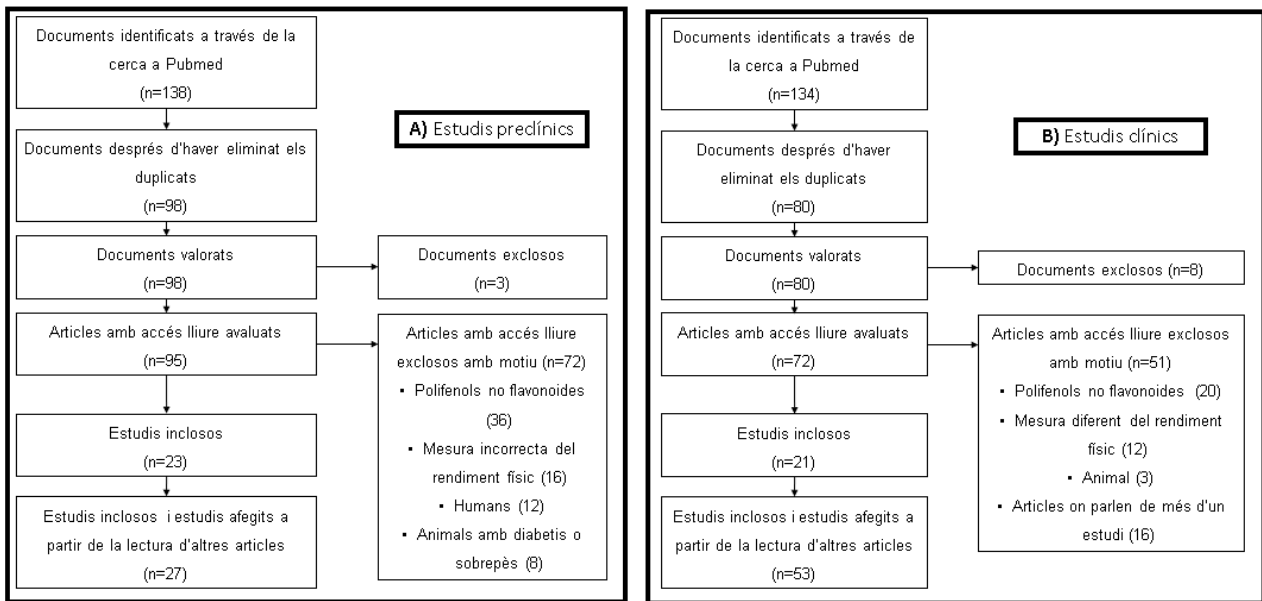


Figura 1. Diagrama de flux del procés i els motius de selecció dels 27 estudis pre-clínic (A) i dels 53 estudis clínics (B) inclosos en aquest treball. La cerca s'ha realitzat a la base de dades Pubmed i s'han utilitzat dos conceptes principals: rendiment físic a través de "exercise performance" o "endurance" i polifenols, concretament la família dels flavonoides a través de "polyphenols" o "flavonoids". Van sortir un total de 138 i 134 articles respectivament. Els articles duplicats [40 i 54], que no permetien l'accés gratuït, ni a través de la biblioteca de la Universitat de Barcelona [2 i 8] i que estaven en una llengua diferent de l'anglès o l'espanyol [1] es van excloure. Per a ser inclosos els estudis havien de complir: a) Mesura del rendiment físic amb unitats de temps o distància recorreguda, b) Principal compost bioactiu fos un flavonoide, c) L'animal d'experimentació fos rata o ratolí sans, en el cas dels preclínic o Humans sans, en el cas dels clínics. Dels 138 articles trobats, se'n van eliminar 115 i se'n van incloure 23. A més, la lectura d'aquests va portar a trobar-ne d'altres [4] i, per tant, es pot dir que en el període establert de cerca (del 2005 fins al 2020) existeixen 27 articles que estudien l'efecte dels flavonoides sobre el rendiment en rates o ratolins. Pel que fa als estudis clínics, dels 134 articles trobats se'n van eliminar 113 i s'han inclòs 21. A més, la lectura d'aquests va portar a trobar-ne d'altres [32] i, per tant, es pot dir que en el període establert de cerca (del 2005 fins al 2020) existeixen 53 articles que parlen sobre l'efecte dels flavonoides sobre el rendiment físic en humans.

La durada de les intervencions també és molt variable, havent-hi alguna intervenció on estudiaven l'efecte agut d'un sol dia de suplementació, fins a altres en les quals la intervenció dietètica arribava a les 10 setmanes (**Annex I**). Dels 27 estudis seleccionats, en 22 d'ells (81,48%) es va trobar un efecte significatiu en el rendiment dels animals, i de manera similar per a tots els tipus de flavonoides (al voltant del 70%-100% aproximadament) (**Annex I** i **Figura 2b**). De fet només en 5 no es va observar efecte, en algun cas per la curta durada de la intervenció, i en un d'ells es va apreciar una disminució del rendiment. D'aquests resultats es pot concloure que a nivell pre-clínic la intervenció experimental amb flavonoides millora el rendiment físic.

Pel que fa als estudis clínics, s'ha seguit una estratègia de cerca semblant a la dels estudis pre-clínic (**Figura 1b**). Les principals característiques dels 53 estudis es poden trobar a l'**Annex II** i classificat de manera més resumida a la **Figura 3**.

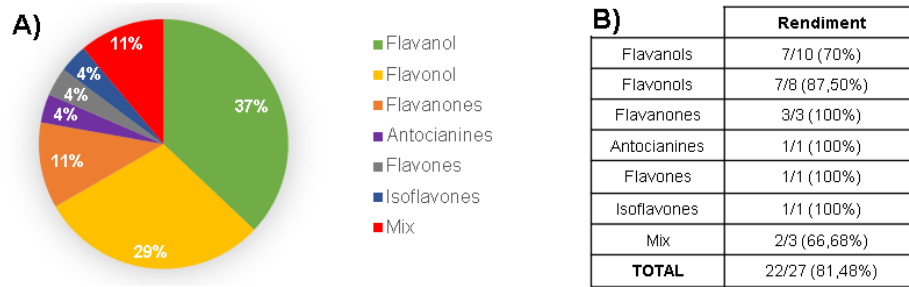


Figura 2. Classificació dels 27 estudis pre-clínics sobre flavonoides i rendiment. **A)** Percentatge d'estudis en funció del tipus de flavonoide estudiat. **B)** Proporció d'estudis amb millora del rendiment físic per efecte de la intervenció nutricional amb flavonoides. Es mostra la proporció i, entre parèntesi, el percentatge d'estudis amb efecte de millora significativa en el rendiment.

Les famílies de flavonoides més estudiades són les antocianines que es troben en aliments com la cirera àcida i la grosella negra, seguit dels flavonols, on predomina la quercetina (**Figura 3a**). Aquests dos grups de flavonoides representen aproximadament la meitat dels estudis inclosos. Els participants d'aquests estudis eren homes d'entre 20 i 30 anys i que tenien un estil de vida actiu. L'administració dels flavonoides era a través d'una matriu alimentària com és el cas del cacau, formant part d'extractes encapsulats o dissolts en aigua i, en el cas de la quercetina, algunes ocasions en forma de xiclet. La quantitat de flavonoide administrada i la durada de les intervencions també és molt variable; poques hores abans de la realització de la prova física fins intervencions de 10 setmanes de durada (**Annex II**). Dels 53 estudis inclosos, en 17 d'ells (32%) es va trobar un efecte significatiu en el rendiment físic, i de manera similar per a tots els tipus de flavonoides (entre el 25% i el 50% aproximadament) (**Annex II i Figura 3b**). Aquesta millora en el rendiment s'ha obtingut en baixa proporció en quatre de les sis famílies de flavonoides i en participants amb un nivell físic diferent: persones sedentàries, persones amb un estil de vida actiu i esportistes amateurs i d'elit.

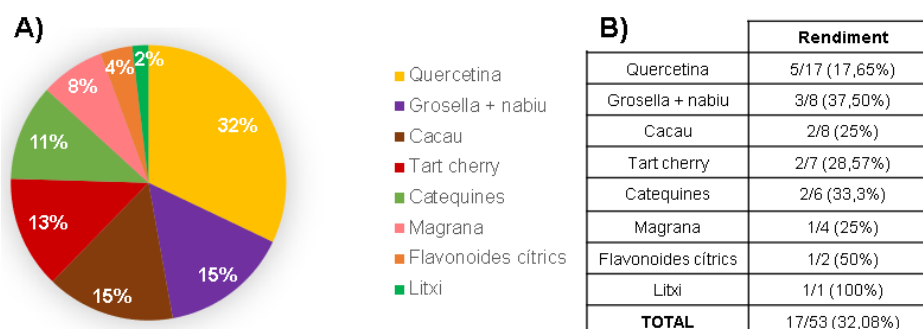


Figura 3. Classificació dels 53 estudis clínics sobre rendiment i flavonoides. **A)** Percentatge d'estudis en funció del tipus d'aliment estudiat. **B)** Proporció d'estudis amb millora del rendiment físic per efecte de la intervenció nutricional amb aliments rics en flavonoides. Es mostra la proporció i, entre parèntesi, el percentatge d'estudis amb efecte de millora significativa en el rendiment.

D'aquests resultats es pot concloure que l'efecte de l'administració de flavonoides sobre el rendiment físic en estudis clínics és inferior respecte els estudis preclínics, sent del 32% i del 80% respectivament.

1.3 Flavonoides i immunosupressió induïda per l'exercici

Un dels sistemes en el qual es produeixen canvis durant la pràctica d'exercici físic és el sistema immunitari. La principal funció d'aquest sistema és la defensa contra microorganismes patògens gràcies a l'acció dels elements solubles i cel·lulars. Les cèl·lules que formen la primera línia de defensa són les cèl·lules Natural Killer, els neutròfils, els monòcits i les cèl·lules dendrítiques, constituint la resposta immunitat innata. Aquesta resposta es caracteritza per la seva inespecificitat davant el patogen, mentre que la resposta immunitària adaptativa és més específica i lenta en la seva actuació, formant la segona línia de defensa, i inclou els limfòcits B i T (15,16). Durant l'exercici s'alliberen catecolamines i, en conseqüència, hi ha un increment de les principals subpoblacions de leucòcits (inclou totes les cèl·lules immunitàries) ja que aquestes presenten receptors β 2-adrenèrgics en la seva membrana. En el període de recuperació hi segueix havent un augment en el número de neutròfils mentre que el número de limfòcits i monòcits disminueix (17). Sessions d'exercici intenses i de llarga durada també fan que hi hagi una disminució en la funcionalitat de les cèl·lules immunitàries. Entrenaments moderats-intensos de curta durada tenen poc efecte sobre la funció cel·lular immunitària, mentre que si requereixen un treball excessiu durant un període llarg de temps (>1,5h) sembla reduir la normal funcionalitat de la major part de les subpoblacions de leucòcits (18).

És en aquest context en el qual s'emmarca la hipòtesi de la J invertida (**Figura 4**). Per una banda, l'exercici practicat de manera regular i de moderada intensitat millora la resposta immunitària mentre que per l'altre, el sedentarisme i la pràctica d'exercici vigorosa porta a una immunodepressió i, sobretot aquest últim, un elevat risc de patir infeccions (19).

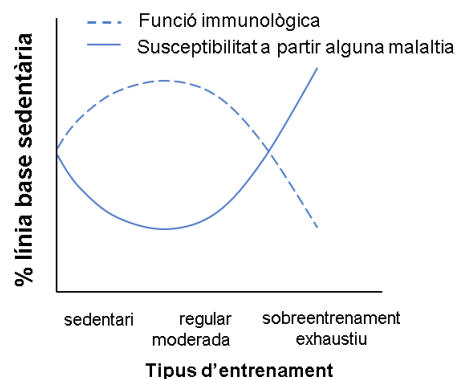


Figura 4. La hipòtesi de la J invertida emmarcada en la immunologia de l'exercici físic. Modificada de (19).

D'entre totes les estratègies nutricionals que s'han estudiat per contrarestar la immunosupressió induïda per l'exercici físic extenuant, només s'ha demostrat la efectivitat de manera parcial amb la ingesta de carbohidrats

durant la pràctica d'exercici (20). Els suplementos nutricionals, antioxidants i fitoquímics, com la quercetina s'han estudiat per la seva potencial capacitat de minimitzar les alteracions en la resposta immunitària. Tanmateix, l'evidència no és suficient per recomanar aquestes estratègies nutricionals per prevenir-la (18). Dels estudis inclosos en aquesta revisió, només un estudi pre-clínic (21) inclou, a més de les mesures de rendiment, l'efecte de l'administració dels flavonoides sobre la immunosupressió induïda per l'exercici (**Annex I**). Pel que fa als estudis clínics, un total de cinc intervencions estudien aquest efecte, sent la quercetina el compost estudiat en tots ells (**Annex II**).

2 Objectius

Aquest treball s'emmarca en una de les línies del grup de recerca d'Autoimmunitat i Tolerància del Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona. La línia de recerca esmentada s'anomena "Immunomodulació per compostos antioxidants" i, concretament, aquest treball té com a objectiu estudiar l'efecte de l'exercici físic extenuant i la dieta sobre el rendiment i el sistema immunitari a nivell preclínic.

La **hipòtesi** en aquest treball és que dietes riques en flavonoides -com els del cacau i la pròpia hesperidina- poden tenir un efecte positiu sobre el rendiment en l'exercici físic, el seu paper en la extenuació i la consegüent immunosupressió associada.

Per tant, l'**objectiu principal** consisteix en estudiar l'impacte de dietes riques en cacau i/o hesperidina sobre variables de salut general i de rendiment físic en un model experimental d'exercici físic extenuant en rates. Per tal d'assolir aquest objectiu principal es planteja com a **objectius específics** avaluar l'impacte de les dietes, l'exercici extenuant i la seva interacció sobre: rendiment físic, pes corporal, eficiència energètica, pes d'òrgans, variables sanguínies.

En aquest treball es presenten resultats de dues de les tres cohorts que estan previstes dur a terme d'aquesta intervenció en la globalitat del projecte.

3 Material i mètodes

3.1 Disseny experimental

El disseny experimental d'aquesta intervenció es resumeix a la **Figura 5**. Es va iniciar l'experiment amb un període d'habitució al nou entorn, la cinta de córrer o treadmill, que va durar 10 dies. Un cop finalitzat aquest

període es va fer la selecció dels animals (veure apartat 3.2) sedentaris (SED) i corredors (COR). Després d'aquesta selecció, es va començar la intervenció nutricional i la pauta d'exercici que va durar 6 setmanes. Excepcionalment, degut a la situació provocada pel Sars-CoV-2, la segona cohort va haver de finalitzar-se una setmana abans i només es van poder completar 5 de les 6 setmanes d'entrenament.

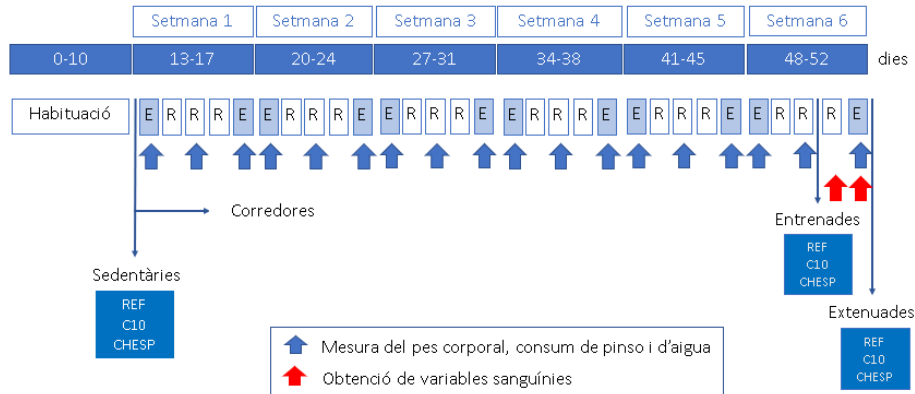


Figura 5. Disseny experimental. REF = dieta referència. C10 = dieta cacau 10%. CHESP = dieta cacau 10% i 0,5% hesperidina. E = extenuació. R = entrenament. Modificat de (21).

La intervenció nutricional es va realitzar en tres grups: referència (REF), cacau (C10) i cacau amb hesperidina (CHESP) (veure apartat 3.3). El pes corporal i el consum de pinso i d'aigua es va registrar amb freqüència gairebé diària (veure apartat 3.5). La pauta d'exercici incloïa dues proves d'extenuació a la setmana i tres dies d'entrenament, amb descans el cap de setmana (veure apartat 3.4). L'última setmana d'entrenament, entre les rates corredores, es va realitzar la selecció d'aquelles que serien extenuades (EXT) i les que no (ENT), per poder observar l'efecte que tenia l'exercici físic extenuant sobre el sistema immunitari. Per a aquesta selecció es va tenir en compte les dades de la darrera prova d'extenuació (en el cas de la primera cohort va ser l'últim dilluns mentre que per la segona cohort va ser divendres, degut al Sars-CoV-2) i els tres millors de cada dieta, van ser les extenuades. La diferència entre els animals entrenats i els extenuats és que els primers es van eutanasiar 24 hores després d'un entrenament i les segones, immediatament després d'haver realitzat la prova d'extenuació final (veure apartat 3.4). El dia de sacrifici es van obtenir una sèrie de mostres per a la globalitat del projecte, i d'entre elles, les que s'inclouen en aquest treball: òrgans, dels quals es van registrar el pes, i mostres de sang. Finalment, per tal d'estudiar tant l'efecte de l'exercici físic com el de la dieta, es van fer un total de 9 grups; tres grups per les diferents dietes (referència, cacau i cacau amb hesperidina) i en cada un d'ells, tres condicions d'exercici (sedentàries, entrenades i extenuades).

3.2 Material biològic

Per realitzar aquest treball es va disposar de 30 rates Lewis femelles (Janvier Labs, Le Genest St Isle, França) amb 6 setmanes d'edat a l'arribada, per cada cohort. Aquest animals es van ubicar a la Unitat

d'Experimentació Animal (UEA) de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona en condicions controlades de temperatura, humitat i cicles de 12 h llum – 12 h fosc i d'accés lliure al pinso i a l'aigua. L'estudi va ser aprovat i realitzat segons les normes d'ús d'animals d'experimentació del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (CEEA-UB) (Ref. 517/18).

3.3 Dietes i intervenció nutricional

Per tal d'estudiar l'efecte del cacau i l'hesperidina sobre el rendiment i el sistema immunitari es van dissenyar tres dietes: dieta referència (REF), dieta cacau al 10% (C10) i dieta cacau al 10% + hesperidina al 0,5% (CHESP). Els pinsos base que es van utilitzar per a l'elaboració dels pinsos es van obtenir de l'empresa Envigo (Barcelona, Espanya). El pinso base utilitzat per a la preparació de la dieta amb cacau (TD. 180627) és una modificació del pinso base AIN-93M, traient-li les quantitats de nutrients que aporta la incorporació del cacau al 10%. El cacau és de la marca Idilia (Barcelona, Espanya) i la hesperidina va ser subministrada per Ferrer HealthTech (Múrcia, Espanya) amb una puresa del 88,7% (92% isòmer S), contenint 5,1% d'isonaringina, 2,9% de didimina, 0,2% d'hesperitina i 0,4% de neohesperidina.

Així, per a l'elaboració del pinso de cada grup s'afegeix: dieta referència (1000 g de pinso AIN-93M, TD. 94048), dieta cacau al 10% (900 g de pinso TD. 180627 + 100 g de cacau pur (Idilia)) i dieta cacau al 10% + hesperidina al 0,5% (900 g del pinso TD. 180627 + 100 g de cacau pur (Idilia) + 5 g d'hesperidina (Ferrer HealthTech)). Durant el període d'habitució els animals van consumir la mateixa dieta (AIN-93M, TD. 94048). Després de la selecció dels animals corredors i sedentaris, coincidint amb la primera setmana d'entrenament a la cinta de córrer, es va començar a subministrar la dieta corresponent. L'accés al pinso i a l'aigua al llarg de tot l'estudi va ser "*ad libitum*" amb la diferència que durant el període d'habitució no es va monitoritzar.

3.4 Protocol d'exercici

Per tal d'estudiar l'impacte de l'exercici físic sobre el sistema immunitari les rates es van distribuir en dos grups: sedentàries (SED) i corredores (COR). La durada de l'experiment va ser de 8 setmanes, mentre que la durada de la intervenció va ser de 6 setmanes (**Figura 5**). Les dues primeres setmanes corresponen al període d'habitució, acabant amb una prova d'extenuació que determinava quines rates serien SED i quines COR. Durant aquest període els animals van seguir la mateixa pauta d'exercici (**Figura 6**). Després del període d'habitució és quan va començar la intervenció nutricional i l'entrenament on hi havia, en el total de les dues cohorts: 20 rates amb dieta referència (de les quals 8 eren sedentàries i 12 corredores), 20 rates amb dieta cacau (de les quals 8 eren sedentàries i 12 corredores) i 20 rates amb dieta cacau amb hesperidina (de les quals 8 eren sedentàries i 12 corredores).

3.4.1 Pauta d'exercici

L'entrenament i el període d'habitució de les rates es va realitzar en una cinta de córrer (*treadmill*) per a rosegadors. Es va utilitzar la cinta *Exerc3/6 treadmill* (Columbus, OH, USA). Aquest aparell disposa d'una única cinta de córrer amb els separadors opacs mòbils que permet separar tres carrils per a l'entrenament de tres animals simultàniament sense cap distracció. El *treadmill* consta d'un centre de control que permet regular la seva velocitat. Una diferència respecte altres estudis realitzats en aquest grup de recerca és el pendent de la cinta de córrer. En els anteriors (21) no n'hi havia i en aquest, per tal d'accentuar l'efecte de l'entrenament i l'extenuació, es va posar des de primer dia un pendent d'uns 5° aproximadament. Les dues primeres setmanes d'experiment, es va realitzar el període d'habitució. En aquest s'incrementava el temps i la velocitat de la cinta de córrer (**Figura 6**).

Dilluns	Dimarts	Dimecres	Dijous	Divendres
		Habitució 5 min, 0 m/min	Habitució 5+5 min, 0+3m/min	Habitució 10 min, 3 m/min
Habitució 10 min, 6 m/min	Habitució 15 min, 12 m/min	Habitució 20 min, 15 m/min	Prova extenuació	Selecció

Figura 6. Pauta d'exercici en el període d'habitució.

El dijous de la segona setmana, es va realitzar la prova d'extenuació que seleccionava quines rates serien corredores i quines sedentàries. Els 30 animals van ser sotmesos a la mateixa prova d'extenuació: córrer durant 10 minuts a 15 m/min i, passat aquest temps s'incrementava la velocitat 3 m/min cada 2 minuts. Aquell dia es va anotar la distància recorreguda, el temps i la velocitat màxima que havien assolit. Durant el període d'habitució hi havia diferents caràcters dels animals on uns es van adaptar bé a les velocitats marcades, mentre que d'altres no. Per tal d'homogeneïtzar els grups es van tenir en compte les velocitats a les quals havien arribat les rates i el seu pes corporal. A partir de la tercera setmana de l'experiment, la primera setmana d'intervenció, el grup de SED no van realitzar exercici físic mentre que el grup de COR van començar l'entrenament segons la pauta d'exercici (**Figura 7**). La velocitat dels dies d'entrenament s'explica en el següent apartat.

3.4.2 Velocitat i rendiment

Una setmana d'entrenament del període d'intervenció es caracteritza per dues extenuacions, una el dilluns (A) i una altra el divendres (B) i per un entrenament els tres dies restants (**Figura 7**). Una extenuació s'estructura: durant 15 minuts corren a una velocitat constant, i un cop passats aquests 15 minuts, s'incrementa la velocitat 3 m/min cada 2 minuts. El que varia d'una extenuació en una altra és la velocitat amb

la qual es comença, ja que s'agafa de referència la mitjana obtinguda a l'anterior extenuació. L'extenuació del dilluns (A) comença amb la velocitat mitjana obtinguda l'extenuació anterior (extenuació en la selecció). En el cas de l'extenuació del dilluns de la primera setmana d'intervenció (1A), va ser de 15 m/min. Amb la mitjana de la velocitat màxima a la que arribaven els dilluns (A), es calculava la velocitat a la que entrenarien la resta de la setmana i a la que començaria l'extenuació de divendres (B) (**Figura 7**).

Dilluns	Dimarts	Dimecres	Dijous	Divendres
Extenuació 1A	Entrenament 60% V_{max} ET1A 25 min	Entrenament 60% V_{max} ET1A 30 min	Entrenament 60% V_{max} ET1A 40 min	Extenuació 1B

Figura 7. Pauta d'exercici del període d'intervenció. L'1 fa referència a la primera setmana d'intervenció, la lletra A o B, fa referència a la prova d'extenuació de dilluns i divendres, respectivament.

L'entrenament del dimarts, dimecres i dijous era al 60% de la velocitat mitjana que s'havia assolit en l'extenuació del dilluns, variant el temps: 25, 30 i 40 minuts respectivament (**Figura 7**). Inicialment es calculava el 60% d'aquesta, però com que es va observar que incrementava molt poc setmana a setmana en comparació amb altres estudis realitzats en el aquest grup de recerca (21), finalment es va augmentar fins al 70%. L'increment es va fer a partir de la tercera setmana en la primera cohort i des de la primera setmana en la segona. El model utilitzat d'exercici es basa en el model descrit per Batatinha *et al* (22). La prova d'extenuació final els animals van córrer durant 30 minuts, enlloc de 15, a velocitat constant. Després d'aquests 30 minuts, s'incrementava la velocitat 3 m/min cada 2 minuts fins que els animals deixaven de córrer.

3.5 Obtenció i processament de mostres

3.5.1 Pes corporal i consum de pinso i aigua

El pes corporal dels animals s'obtenia els dilluns, els dimecres i els divendres tant de les rates COR (abans de córrer) com de les SED. Els mateixos dies de la setmana es pesava el pinso i l'aigua trobada i deixada.

3.5.2 Obtenció i processament de mostres biològiques

A temps final, els animals es van anestesiar (ketamina/xil-lacina, Merial Laboratories S.A, Barcelona, Espanya i Bayer A.G., Leverkusen, Alemanya). Es va procedir immediatament a l'exsanguinació i a l'obtenció de nombroses mostres per la globalitat del projecte i, entre elles, per aquest treball específic: l'intestí prim, el cec, la melsa, el fetge, el timus i el cor.

3.5.3 *Variables sanguínies*

Per tal d'observar l'efecte de les dietes i de l'exercici sobre les variables sanguínies, es va utilitzar l'hemocitòmetre automàtic (Spincell, Monlab Laboratoris). L'anàlisi de la sang es va dur a terme entre 20 i 40 minuts després de la seva obtenció. L'hemocitòmetre usa el mètode Coulter® per a fer el recompte de les cèl·lules sanguínies. El mètode està basat en el canvi d'impedància elèctrica que produeixen les cèl·lules sanguínies entre dos elèctrodes (23). Les variables que s'han mesurat i que apareixen al treball són: el número de leucòcits, limfòcits, monòcits i granulòcits.

3.5.4 *Anàlisi estadística*

L'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el programa IBM Social Sciences Software (SPSS, versió 25.0, Chicago, IL, USA). En primer lloc es va comprovar la distribució normal de les dades i la homogeneïtat de les variàncies mitjançant els tests de Shapiro-Wilk i de Levene, respectivament. Les diferències significatives es van considerar quan la $p \leq 0,05$. Quan aquestes dues condicions es confirmaven i només hi havia una variable independent, s'aplicava el test one-way ANOVA. Quan s'obtenien diferències significatives, s'aplicava el test post hoc de Tuckey entre grups. En aquest cas, només es va utilitzar per la variable rendiment quan es mesurava a través de la distància total recorreguda. Quan hi havia dues o més variables independents, es va utilitzar el test two-way ANOVA i, si es detectaven diferències significatives, s'aplicava el test post hoc Tuckey. Aquests tests es van aplicar en les variables següents: eficiència energètica, pes relatiu del cec, fetge i pel que fa les variables sanguínies, el número de limfòcits. Els tests no paramètrics s'aplicaven quan les condicions de normalitat i/o d'homogeneïtat de variàncies no es complien, a través del test de Kruskal-Wallis, seguit del test Mann Whitney U, en el cas de que hi haguessin diferències significatives entre grups. Aquests tests es van utilitzar en el pes relatiu de l'intestí prim, cor, timus i melsa i per les variables sanguínies: número de leucòcits, monòcits, granulòcits. El test de mesures repetides es va utilitzar per avaluar variables monitoritzades al llarg de l'estudi (rendiment, comparant la distància recorreguda en cada extenuació i pes corporal), seguit de test one way-ANOVA i el post-hoc Tuckey, per aquelles variables que eren normals i que tenien homogeneïtat de variàncies; mentre per aquelles variables que no eren normals i/o les seves variàncies no eren homogènies, es va utilitzar els tests no paramètrics.

4 Resultats

4.1 Rendiment

Una de les principals variables que permet avaluar el rendiment en un procés d'entrenament és la distància total recorreguda durant l'estudi, que en aquest cas inclou la distància recorreguda des de l'extenuació del

dilluns de la primera setmana (1A) fins la del divendres de la cinquena setmana (5B) (**Figura 8a**). Cap de les dues dietes riques en flavonoides va modificar significativament aquesta variable. Una altra manera de mesurar el rendiment és a través de la distància que recorren els animals en cada extenuació. Com es pot observar a la **Figura 8b**, a partir de l'extenuació del divendres de la segona setmana (2B), hi ha un increment en el rendiment en els tres grups de dieta -respecte les condicions inicials- i fins l'últim entrenament de la cinquena setmana (5B). Aquesta evolució té una excepció, ja que aquest increment només s'observa en l'extenuació de dilluns de la tercera setmana (3A) en el grup referència i no per efecte de les dietes. La comparació d'un dia concret respecte el dia anterior permet observar en quin moment es produeix un canvi significatiu en el rendiment durant la intervenció. Aquest punt de millora s'observa únicament en el divendres de la tercera setmana d'entrenament (3B) respecte el dilluns (3A). De nou, no s'aprecien diferències per efecte de les dietes.

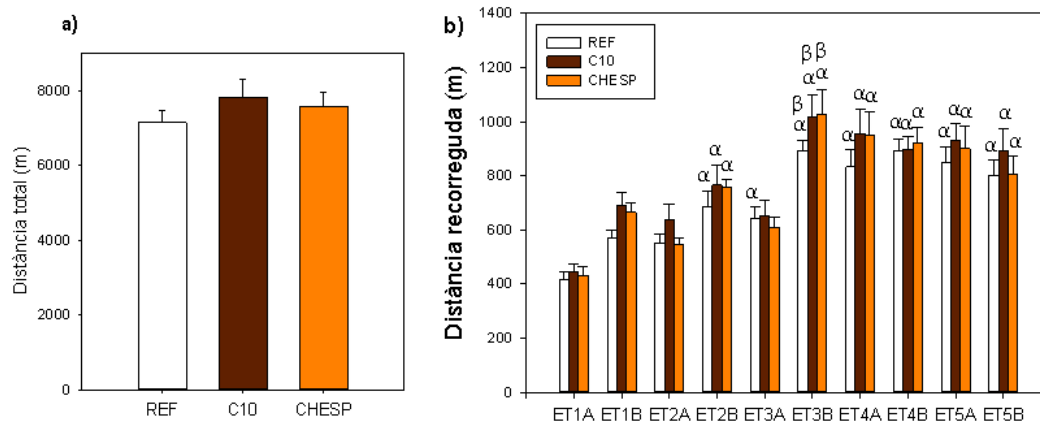


Figura 8. a) Distància total recorreguda des de la primera extenuació fins a la del divendres de la cinquena setmana d'entrenament. Els resultats es mostren com mitjana \pm error estàndard (e.e) ($n=12$). **b)** Distància recorreguda en cada extenuació (ET) durant les cinc primeres setmanes d'entrenament. Els resultats es mostren com mitjana \pm e.e ($n=12$). Diferències significatives: ^a $p < 0,05$ vs primera extenuació (ET1A), ^b $p < 0,05$ vs extenuació del dia anterior.

4.2 Increment de pes corporal

En la **Figura 9** s'observa l'evolució del pes corporal dels animals durant tot l'estudi per les rates sedentàries i corredores, respectivament i en els tres grups d'estudi. En el cas de les rates sedentàries, la dieta rica en cacau disminueix significativament l'increment ponderal a partir del primer dia d'entrenament des de la tercera setmana (3A) fins al primer dia de la cinquena (5A), ja que aquesta diferència perd la significança estadística en l'últim dia de l'última setmana (**Figura 9a**). Pel que fa la dieta rica en els compostos bioactius del cacau i la pròpia hesperidina (grup CHESP) no s'observa aquesta disminució significativa fins el divendres de la setmana 3 d'entrenament (3B) i es manté fins la cinquena setmana, exceptuant el dilluns d'aquella setmana.

En la **Figura 9b**, on es mostra l'evolució del pes corporal de les rates corredores, es pot observar que el consum de la dieta rica en cacau i la dieta rica en cacau i hesperidina disminueix de manera significativa el pes corporal de les rates, respecte el grup referència, a partir de la segona setmana i fins al final de la cinquena. Aquest efecte però, es manté en el grup cacau amb hesperidina però no en el grup cacau el primer dia de la tercera setmana i al final de la cinquena setmana. Per tant, independentment de la pràctica o no d'exercici físic dels animals, les dietes redueixen el pes corporal. No s'observa un efecte additiu o potenciador entre el cacau i l'hesperidina, per tant l'efecte es pot atribuir a la presència de cacau.

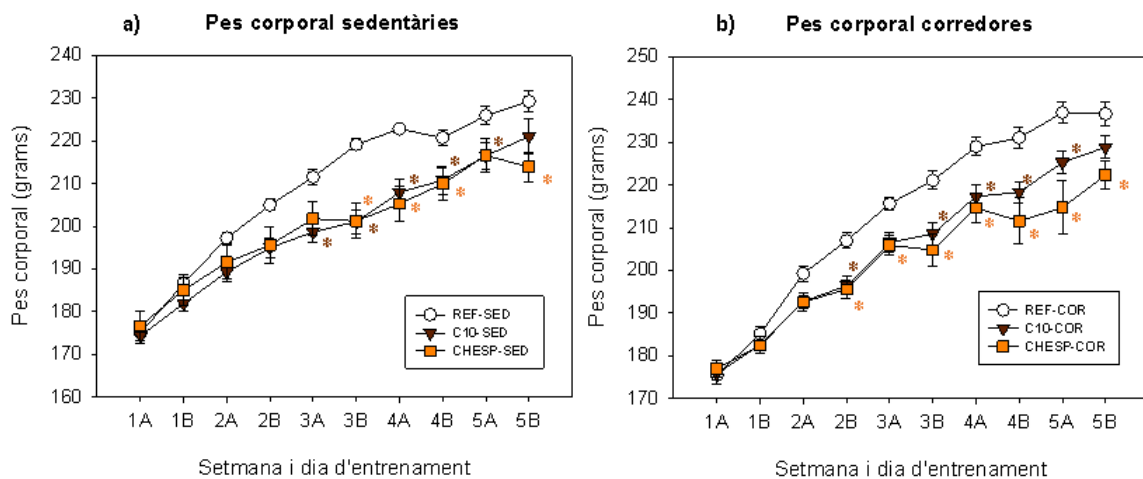


Figura 9. Evolució del pes corporal de les rates sedentàries (a) i de les rates corredores (b) durant les cinc primeres setmanes d'entrenament. El número indica la setmana d'entrenament i la lletra dilluns (A) o divendres (B). Els resultats es mostren com mitjana \pm e.e (n=8 per sedentàries i n= 12 per corredores)). Diferències significatives: * $p < 0,05$ vs grup referència en el mateix dia.

Quan es compara l'efecte de l'exercici en l'increment de pes corporal en un grup d'animals amb la mateixa dieta, no s'observen diferències significatives. Excepcionalment, en el grup amb la dieta referència, concretament a l'inici de la tercera setmana d'entrenament, s'observa un increment significatiu del pes en les corredores respecte les sedentàries.

4.3 Eficiència energètica

L'eficiència energètica (**Figura 10**) és un quocient que es calcula dividint el consum de pinso entre l'increment de pes al llarg de l'estudi. L'exercici, com a variable global modifica de manera significativa (2WA, $p < 0,05$) l'eficiència, independentment de la dieta, i la dieta modifica significativament (2WA, $p < 0,05$) l'eficiència energètica, independentment de l'exercici. Les diferències degudes a la dieta es mostren de manera específica a la **Figura 10** per cada condició d'entrenament, en la qual s'observa que les dues dietes riques en

compostos bioactius disminueixen significativament l'eficiència energètica. A més, aquest efecte també s'observa en la dieta cacau amb hesperidina respecte la dieta cacau.

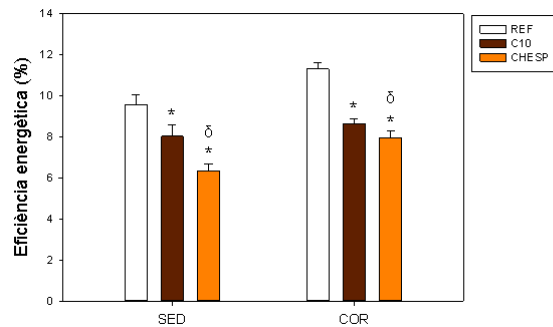


Figura 10. Eficiència energètica en funció de l'exercici físic i de la dieta. Els resultats es mostren com mitjana \pm e.e (n=4). Diferències significatives: * $p < 0,05$ vs grup referència i $\delta p < 0,05$ vs grup cacau, dintre de la mateixa condició d'activitat física (sedentàries, SED o corredores, COR).

4.4 Pes d'òrgans

La **Figura 11** mostra el pes relatiu de diversos òrgans clau en el metabolisme de nutrients així com en la resposta immunitària, com són l'intestí prim, el cec, el fetge, el cor, el timus i la melsa. L'intestí prim i el cec són dos dels òrgans que mostren un major número de diferències significatives.

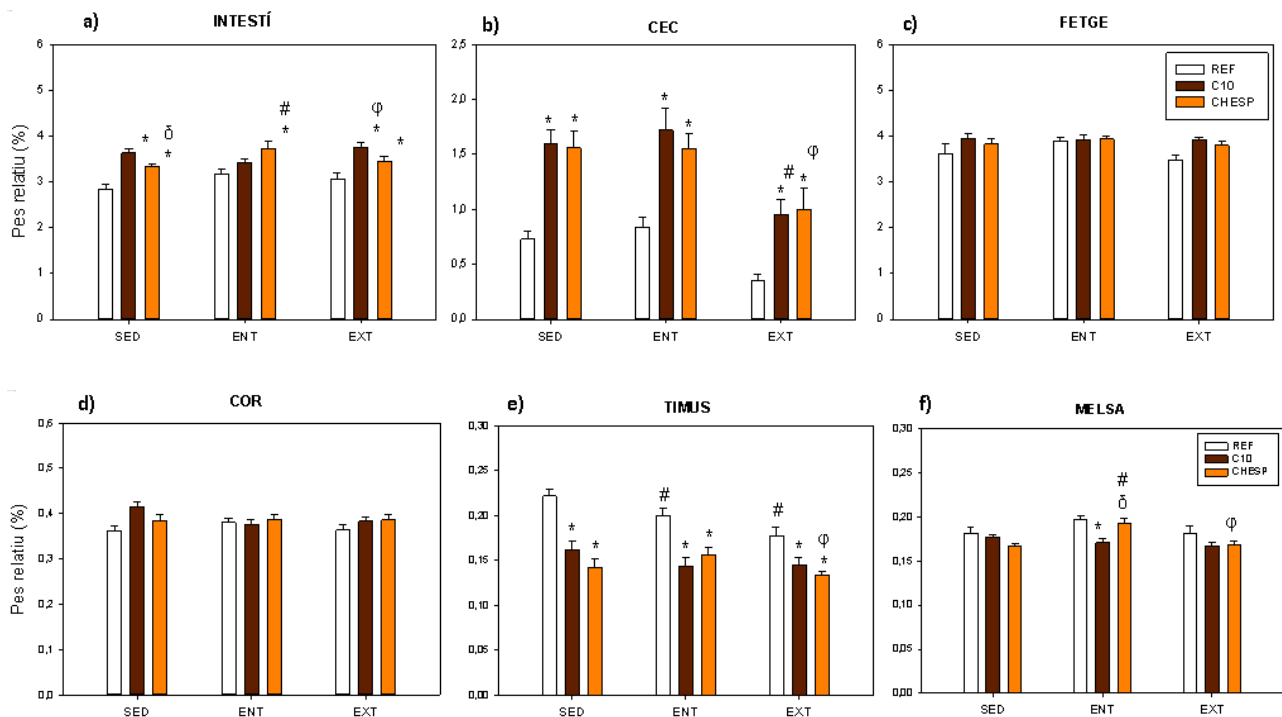


Figura 11. Pes relatiu (%) del intestí (a), cec (b), fetge (c), cor (d), timus (e) i melsa (f). Els resultats es mostren com mitjana \pm e.e (n=6-8). Diferències significatives: * $p < 0,05$ vs grup referència, $\delta p < 0,05$ vs grup cacau, # $p < 0,05$ vs grup respectiu en condicions sedentàries i $\phi p < 0,05$ vs grup respectiu en condicions entrenades.

Per una banda, respecte a l'efecte de les dietes en el pes de l'intestí prim (**Figura 11a**), una dieta rica en cacau i hesperidina augmenta significativament el pes de l'intestí en les tres condicions d'exercici. S'observa el mateix efecte amb la dieta rica en cacau excepte per la condició d'entrenament. També es pot observar que hi ha una disminució significativa del pes de l'intestí en les rates sedentàries alimentades amb la dieta cacau i hesperidina respecte les de la dieta cacau. Per l'altre, l'entrenament provoca un augment significatiu del pes de l'intestí en aquelles que havien rebut una dieta rica en cacau i hesperidina respecte la condició sedentària. L'extenuació, alhora, provoca el mateix efecte amb la dieta cacau respecte les entrenades amb la mateixa dieta. Pel que fa el cec (**Figura 11b**), la dieta rica en cacau i la dieta rica en cacau i hesperidina provoca un augment significatiu del pes en les tres condicions d'entrenament. Aquest efecte es veu disminuït per l'extenuació en la dieta cacau respecte condicions sedentàries i en la dieta cacau amb hesperidina respecte condicions d'entrenament. Quant al fetge i al cor (**Figures 11c i 11d**), ni l'exercici ni la dieta indueixen canvis en el seu pes. El timus és el tercer òrgan que mostra més diferències significatives (**Figura 11e**). La dieta rica en cacau i la dieta rica en cacau i hesperidina disminueixen el pes del timus de manera significativa en les tres condicions d'exercici. L'entrenament i l'extenuació provoquen una disminució del pes del timus en aquelles rates amb una dieta referència; i per altra banda, l'extenuació disminueix el pes del timus respecte a condicions d'entrenament només en les rates que eren alimentades amb la dieta cacau i hesperidina. Finalment, l'efecte de la dieta en la melsa (**Figura 11f**) només s'observa en les rates entrenades. El pes relatiu d'aquest òrgan disminueix significativament amb la dieta cacau i alhora s'incrementa de manera significativa amb la dieta cacau amb hesperidina respecte el grup cacau, en condicions d'entrenament. L'efecte de l'exercici s'observa en les rates alimentades amb la dieta cacau i hesperidina; l'entrenament l'augmenta el pes i l'extenuació el disminueix.

4.5 Hemograma

La **Figura 12** resumeix la distribució de cèl·lules immunitàries en les diferents condicions d'exercici i de dieta. El nombre total de leucòcits i de monòcits no experimenta cap canvi ni per efecte de l'entrenament ni de la dieta. En el nombre de limfòcits, hi ha un efecte de l'exercici, independentment de la dieta (2WA, $p < 0,05$), però quan s'estudien les diferències entre les condicions d'entrenament, no se'n observa cap de significativa. Tampoc s'observen diferències per efecte de la dieta. Pel que fa el nombre de granulòcits, una dieta rica en cacau i hesperidina i l'entrenament, indueixen un augment significatiu del nombre tant per efecte de la dieta com per efecte de l'exercici (2WA, $p < 0,05$). A més, s'observa un augment significatiu en el nombre de granulòcits en condicions sedentàries en aquelles alimentades amb una dieta rica en cacau.

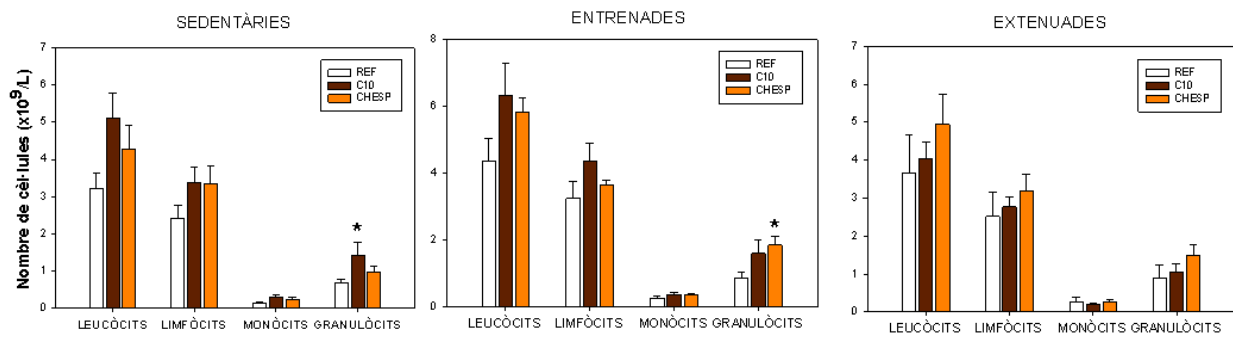


Figura 12. Distribució de les cèl·lules immunitàries (leucòcits, limfòcits, monòcits i granulòcits) en les diferents condicions d'exercici i dieta. Els resultats es mostren com mitjana \pm e.e (n=6-8). Diferències significatives: * $p < 0,05$ vs grup referència.

5 Discussió

Abans d'iniciar la discussió dels resultats obtinguts en aquest treball, cal tenir en compte dues limitacions que han influït en els resultats de l'estudi. Per una banda, l'estudi està previst realitzar-lo en tres cohorts, ja que la mida mostral final ha estat calculada per poder obtenir diferències significatives, si n'hi ha. En aquest treball, com s'ha mencionat anteriorment, es presenten dues cohorts i per tant, el nombre d'animals actualment per grup és encara reduït (el grup de sedentàries és de 8, mentre que el d'entrenades i el d'extenuades és de 6 cadascun). Per aquest motiu, és possible que el nombre d'efectes amb diferències significatives trobades sigui menor que el que es tindrà al final de tot el projecte. Per l'altra banda, hi ha hagut canvis en el disseny experimental de la segona cohort, degut a la situació excepcional provocada pel Sars-CoV-2. Aquesta va haver de finalitzar una setmana abans la intervenció, completant 5 de les 6 setmanes d'entrenament previstes.

A través d'aquest treball es pretén observar l'efecte de dues dietes riques en flavonoides sobre el rendiment i la immunosupressió associada a l'exercici físic extenuant. El model d'exercici físic utilitzat es basa en el model descrit per Batatinha *et al* (22), s'entrena durant sis setmanes, 5 dies a la setmana i la velocitat de l'entrenament es basa en funció del rendiment dels animals durant les extenuacions. S'han utilitzat rates de la soca Lewis, utilitzada prèviament en altres estudis (11,24), i eren femelles, ja que mostren una millor adaptació de l'entrenament respecte els mascles (25).

La variable rendiment s'ha mesurat de dues maneres diferents i ambdues conclouen que les dietes riques en flavonoides no tenen un efecte de millora sobre el rendiment. Les dues mesures de rendiment, distància total recorreguda i la comparació de cada extenuació respecte el primer dia, també s'han analitzat en un estudi realitzat pel mateix grup de recerca en el qual s'emmarca aquest treball (21). En aquest estudi s'observa un increment significatiu en la distància total recorreguda i un pic en el rendiment als inicis de la tercera setmana,

en aquells animals amb una dieta amb hesperidina. Els resultats obtinguts en aquest treball difereixen en ambdues mesures ja que no s'observa diferències ni en la distància total recorreguda ni el canvi de rendiment. La manca d'efecte en el present estudi podria explicar-se pel canvi forçat en el disseny experimental, degut a la situació de confinament i restricció d'accés als laboratoris de la UB, ja que una setmana més d'entrenament podria marcar més la diferència entre els grups. Així mateix i tal i com s'ha comentat anteriorment, potser en finalitzar l'estudi global, és a dir, quan s'inclogui la cohort restant el resultat final sigui diferent. Una de les variables que pot influir en el rendiment dels animals és el pes corporal. Independentment de la pràctica o no d'exercici físic, s'observa que tant la dieta rica en cacau com la dieta rica en cacau i hesperidina, provoquen una disminució de l'increment del pes corporal. Per tant, la hesperidina no presenta un efecte sinèrgic i es pot atribuir aquest efecte al cacau. Aquesta disminució s'observa en rates corredores al final de la segona setmana d'entrenament i en sedentàries a l'inici de la següent i es manté fins al final de la cinquena.

L'efecte del cacau sobre la reducció de l'increment ponderal s'ha descrit anteriorment en estudis realitzats en aquest grup de recerca i en d'altres (26–28). El principal responsable d'aquest efecte és la teobromina tal i com es conclou en un estudi on s'observa aquest efecte tant en les rates que consumeixen cacau com en les que consumeixen teobromina en una proporció idèntica a la que es troba en una dieta amb cacau (29). D'altra banda, la disminució del pes no és deguda a un menor consum de pinso, ja que quan es compara aquesta variable no s'observen diferències en el consum en els tres grups de dieta. En els estudis mencionats anteriorment (26,28), la disminució del pes tampoc és deguda a un menor consum de pinso. Així mateix, la pràctica d'exercici físic no modifica l'increment ponderal en cap de les tres dietes quan es comparen el grup sedentari amb el grup de corredores, excepte un dia puntual en el grup referència. L'increment de pes corporal i el consum de pinso es resumeixen amb el quocient d'eficiència energètica. L'exercici, com a variable, incrementa significativament l'eficiència, independentment de la dieta, i la dieta disminueix de manera significativa l'eficiència energètica, independentment de l'exercici. Les dietes riques en flavonoides disminueixen l'eficiència energètica i a més aquest efecte també s'observa en la dieta cacau amb hesperidina respecte la dieta cacau.

En un estudi recentment publicat en el nostre grup de recerca (30), l'exercici també provoca un augment en l'eficiència energètica. Aquest efecte podria estar explicat per un augment del pes dels ossos i els músculs dels animals corredors (25) tot i que també s'ha observat una disminució de l'eficiència energètica en un estudi amb ratolins obesos, que consumien una dieta alta en greix i realitzaven una pauta d'exercici (31). En canvi, l'hesperidina provoca un augment en l'eficiència energètica (30), mentre que en els resultats presentats

es produeix l'efecte contrari. Per tant, les dietes riques en flavonoides redueixen l'increment de l'eficiència energètica produïda per l'exercici.

Un altra variable estudiada en aquest treball és el pes del òrgans. L'intestí prim i el cec són dos òrgans clau en la resposta immunitària, ja que estan constantment exposats a una alta càrrega antigènica procedents de la dieta i bacteris comensals (32). Així mateix, són els que més en contacte estan amb els components del cacau i la hesperidina. En estudis previs ja s'havia observat que, tot i que una dieta amb cacau no modificava les variables morfològiques de l'intestí, sí que influïa en la funcionalitat del teixit limfoide associat a l'intestí (26). És per això que no és estrany observar com les dues dietes riques en flavonoides provoquen un augment en el pes dels dos òrgans, a excepció del pes de l'intestí prim en les rates entrenades. L'exercici provoca un menor nombre de canvis. A l'intestí, l'entrenament provoca un augment significatiu en el pes en els animals que segueixen una dieta amb cacau i hesperidina. Aquest augment també s'observa en les rates extenuades respecte a les entrenades amb una dieta rica en cacau. En canvi, en el cec, l'extenuació provoca una disminució en el pes relatiu en les rates amb una dieta rica en cacau respecte les sedentàries, i les que segueixen una dieta rica en cacau i hesperidina disminueix respecte les entrenades. Durant la pràctica d'exercici físic extenuant, hi ha l'alliberació d'hormones, entre elles la noradrenalina que indueix vasoconstricció dels vasos sanguinis que irriguen les vísceres com l'intestí i el cec, redistribuint la sang al cor, als pulmons, als músculs i la pell (33). Els resultats referents al cor no concorden amb la literatura publicada, ja que la pràctica d'exercici físic durant un període llarg de temps, provoca un augment en la mida d'aquest òrgan tant en animals com en humans (34,35). L'absència de canvis en el fetge concorda amb els d'un estudi que administraven un 12,5% de cacau en la dieta i tampoc observaven canvis en el pes relatiu del fetge (27). Tal i com s'ha comentat anteriorment, la pràctica d'exercici físic extenuant porta a una redistribució de la sang de les vísceres cap al cor i al múscul, que podria portar a un pes del fetge inferior en les rates extenuades, però no s'observa en aquest cas (33). Tot i que no hi hagi canvis deguts a l'efecte de la dieta en el fetge, en un altre estudi es va veure que els metabòlits del cacau s'acumulaven en el fetge, així com en altres òrgans com en els testicles, el timus, la melsa i els ganglis limfàtics, sobre els quals podrien tenir un possible efecte (36). El timus és un òrgan primari del sistema immunitari encarregat de la maduració dels limfòcits T (16). Les dues dietes riques en flavonoides provoquen una disminució del pes del timus en les tres condicions d'entrenament respecte la dieta referència. En un estudi realitzat en el nostre grup de recerca amb dos condicions de dieta, 4% de cacau administrat via oral i 10% administrat a través del pinso, i els seus respectius grups controls, la dieta cacau incrementava de manera dosi-dependent l'activitat catalasa i superòxid dismutasa al timus, fet que, que promouria un lleu canvi a un ambient oxidant, afavorint la diferenciació i maduració de les cèl·lules

immunitàries i, alhora, podria influir en la maduració de l'òrgan (37). A més, tant l'entrenament com l'extenuació provoca una disminució del pes del timus dels animals amb una dieta referència. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en un altre grup de recerca on també s'observava l'efecte de l'estrès crònic induït per l'exercici físic sobre el pes de diferents òrgans limfoides. L'estrès crònic porta a un augment de la concentració en circulació de les hormones que es troben a la glàndula adrenal indueix l'apoptosi de timòcits i, en conseqüència, la reducció del pes del timus (38). La melsa és un òrgan limfoide secundari i és on s'inicia la resposta als antígens que arriben del torrent circulatori (21). Per efecte de la dieta només s'observen dos canvis, ambdós en el grup de rates entrenades, on la dieta rica en cacau disminueix significativament el pes d'aquest òrgan mentre que la dieta rica en cacau i hesperidina, augmenta comparat amb el grup cacau. Per efecte de l'exercici, en aquelles rates que van rebre una dieta rica en cacau i hesperidina l'entrenament provoca un augment del pes de la melsa respecte a les rates sedentàries però l'extenuació provoca una disminució respecte els animals en condicions entrenament. Les hormones alliberades per la glàndula adrenal durant l'exercici indueixen l'apoptosi de les cèl·lules que formen part de la melsa i la conseqüent reducció del pes (33,38).

Per tal d'avaluar l'efecte de l'exercici físic extenuant sobre el sistema immunitari, s'estudien entre d'altres, les variables sanguínies. Els leucòcits, també anomenats glòbuls blancs, són un conjunt de cèl·lules sanguínies que es classifiquen en granulòcits i agranulòcits en funció de la presència o no de grànuls en el seu interior. Dins dels granulòcits es troben els neutròfils, eosinòfils i els basòfils; mentre que formant els agranulòcits hi ha els limfòcits (NK, T i B) i els monòcits que quan actuen en els teixits s'anomenen macròfags (39). La immunosupressió es caracteritza per un augment en el nombre de neutròfils en sang mentre que el nombre de limfòcits i monòcits disminueix (17). Aquesta descripció clàssica no concorda amb els resultats obtinguts en aquest estudi ja que, ni l'entrenament ni l'extenuació provoquen canvis significatius ni en el número de leucòcits, limfòcits ni monòcits. L'entrenament, però, indueix a un augment en la concentració de granulòcits en aquells animals amb la dieta cacau amb hesperidina. Tot i això, s'observa l'efecte de l'exercici sobre el nombre de limfòcits independentment de la dieta. Ara bé, quan s'estudien les diferències entre les condicions d'entrenament, no s'observa cap efecte. Aquests resultats podrien ser deguts al canvi en el disseny experimental, ja que els animals de la segona cohort van realitzar la prova d'extenuació un dia que normalment no corrien o per la setmana d'entrenament que no es va poder arribar a realitzar. En canvi, la dieta sí que provoca canvis significatius, que només s'observen en els granulòcits però no en les altres subpoblacions sanguínies. Els dos compostos modulen de manera positiva la resposta inflamatòria. Pel que fa el cacau, determinats flavonols i procianidines que el formen, modulen la transducció de senyals induïts per

lipopolisacàrids, concretament, els implicats en l'esclat oxidatiu i els marcadors d'activació (8). Respecte a l'hesperidina, en un estudi realitzat utilitzant un model d'inflamació en rata, l'administració d'aquest flavonoide promou una reducció de la concentració de nitrit en sèrum i teixits, suggerint el potencial de l'hesperidina com a millorant de la biodisponibilitat de l'òxid nítric (40). Tot i les propietats antiinflamatòries dels flavonoides, que induïrien a un menor nombre de granulòcits, aquesta disminució no s'observa en els resultats presentats.

6 Conclusions

Tot i les dues principals limitacions que han pogut influir en els resultats d'aquest treball, que són la presentació de dues de les tres cohorts previstes realitzar i el canvi en el disseny experimental degut a la situació excepcional provocada pel Sars-Cov-2, s'han pogut observar diferències significatives en les variables morfomètriques i immunològiques.

- Les dietes riques en flavonoides no milloren de manera significativa el rendiment físic dels animals.
- El cacau provoca una disminució en l'increment ponderal de les rates, efecte que s'observa tant en el grup de sedentàries com el de corredores. Per altra banda, no s'observa un efecte additiu entre el cacau i hesperidina.
- Les dietes riques en flavonoides disminueixen l'eficiència energètica, sent més accentuat en la dieta amb els dos compostos bioactius, mentre que l'exercici físic l'incrementa.
- Les dietes riques en flavonoides augmenten el pes de l'intestí i el cec, mentre que afavoreixen la maduració del timus i, per tant, una disminució dels seu pes. L'exercici també modifica el pes d'aquests òrgans, però ni la dieta ni l'exercici modifiquen el pes del fetge ni del cor.
- Els granulòcits són la subpoblació leucocitària que presenta un major número de canvis degut a l'exercici i la dieta mentre que la resta de subpoblacions no en presenten tants.
- L'hesperidina sembla no tenir un efecte sinèrgic amb el cacau sobre l'acció de les diferents variables estudiades en aquest treball.

Quan es disposi de les tres cohorts caldrà observar si les variables estudiades en aquest treball segueixen la mateixa tendència o no. A més, és podran realitzar proves amb totes les mostres biològiques que permetran una aproximació als canvis fisiològics induïts tant per l'exercici com per les dietes riques en flavonoides sobre el rendiment, l'exercici físic extenuant i la immunosupressió associada.

7 Bibliografia

1. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-33.
2. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727-74.
3. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants Redox Signal.* 2013;18(14):1818-92.
4. Cook MD, Willems MET. Dietary anthocyanins: a review of the exercise performance effects and related physiological responses. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2019;29(3):322-30.
5. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc.* 2010;69:273-8.
6. McShea A, Leissle K, Smith MA. The essence of chocolate: a rich, dark, and well-kept secret. *Nutrition.* 2009;25(11-12):1104-5.
7. Aprotosoiaie AC, Luca SV, Miron A. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products-an overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2016;15(1):73-91.
8. Pérez-Cano FJ, Massot-Cladera M, Franch À, Castellote C, Castell M. The effects of cocoa on the immune system. *Front Pharmacol.* 2013;4:1-12.
9. Katz DL, Doughty K, Ali A. Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidants Redox Signal.* 2011;15(10):2779-811.
10. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phyther Res.* 2015;29(3):323-31.
11. Estruel-Amades S, Massot-Cladera M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M, Camps-Bossacoma M. Hesperidin effects on gut microbiota and gut-associated lymphoid tissue in healthy rats. *Nutrients.* 2019;11(2):1-16.
12. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1243-76.

13. Bentley DJ, Dank S, Coupland R, Midgley A, Spence I. Acute antioxidant supplementation improves endurance performance in trained athletes. *Res Sport Med.* 2012;20(1):1-12.
14. Myburgh KH. Polyphenol supplementation: benefits for exercise performance or oxidative stress? *Sport Med.* 2014;44(1):S57-70.
15. Walsh NP. Recommendations to maintain immune health in athletes. *Eur J Sport Sci.* 2018;18(6):820-31.
16. Abbas K, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular.* 6 ed. Madrid. Elsevier; 2008. 576p.
17. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, et al. Position statement. Part one: immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2011;17:6-63.
18. Peake JM, Oliver Neubauer X, Walsh NP, Simpson RJ. Recovery of the immune system after exercise. *J Appl Physiol.* 2017;122:1077-87.
19. Woods J, Davis J, Simth J, Nieman D. Exercise and cellular innate immune function. *Med Sci Sport Exerc.* 1999;31(1):57-66.
20. Bermon S, Castell LM, Calder PC, Bishop NC, Blomstrand E, Mooren FC, et al. Consensus statement. Immunonutrition and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2017;23:8-50.
21. Estruel-Amades S, Massot-Cladera M, Garcia-Cerdà P, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M, et al. Protective effect of hesperidin on the oxidative stress induced by an exhausting exercise in intensively trained rats. *Nutrients.* 2019;11(4):1-17.
22. Batatinha HAP, Lima EA, Teixeira AAS, Souza CO, Biondo LA, Silveira LS, et al. Association between aerobic exercise and rosiglitazone avoided the NAFLD and liver inflammation exacerbated in PPAR- α knockout mice. *J Cell Physiol.* 2017;232:1008-19.
23. ASTM International [Internet]. West Conshohocken, PA: ASTM International; 1996-2020. ASTM F2149-16: Standard test method for automated analyses of cells—the electrical sensing zone method of enumerating and sizing single cell suspensions; 2016 [citat 23 maig 2020]. Disponible a: <https://www.astm.org/Standards/F2149.htm>
24. Camps-Bossacoma M, Franch À, Pérez-Cano FJ, Castell M. Influence of hesperidin on the systemic and intestinal rat immune response. *Nutrients.* 2017;9(6):1-14.

25. Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Cigarroa I, Gagliano H, Fuentes S, Armario A, et al. Long-term moderate treadmill exercise promotes stress-coping strategies in male and female rats. *Sci Rep.* 2015;5.
26. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Castellote C, Permanyer J, et al. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem.* 2008;19(8):555-65.
27. Matsui N, Ito R, Nishimura E, Yoshikawa M, Kato M, Kamei M, et al. Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition.* 2005;21(5):594-601.
28. Massot-Cladera M, Pérez-Berezo T, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch Biochem Biophys.* 15 novembre 2012;527(2):105-12.
29. Camps-Bossacoma M, Garcia-Aloy M, Saldañ A-Ruiz S, Cambras T, González-Domínguez R, Ngels Franch À, et al. Role of theobromine in cocoa's metabolic properties in healthy rats. *J Agric Food Chem.* 2019;67(13):3605-14.
30. Ruiz-Iglesias P, Estruel-Amades S, Camps-Bossacoma M, Massot-Cladera M, Franch À, Pérez-Cano FJ, et al. Influence of hesperidin on systemic immunity of rats following an intensive training and exhausting exercise. *Nutrients.* 2020;12(5):1-18.
31. Chang G-R, Hou P-H, Chen W-K, Lin C-T, Tsai H-P, Mao FC. Exercise affects blood glucose levels and tissue chromium distribution in high-fat diet-fed C57BL6 mice. *Molecules.* 2020;25(7):1-12.
32. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano F, Castellote C, Franch A, Castell M. The bowel: a key component of the immune system. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008;100(1):29-34.
33. van Wijck K, Lenaerts K, Grootjans J, Wijnands KAP, Poeze M, van Loon LJC, et al. Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: Strategies for evaluation and prevention. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(2):G155-68.
34. Gilbert CA, Nutter DO, Felner JM, Perkins J V., Heymsfield SB, Schlant RC. Echocardiographic study of cardiac dimensions and function in the endurance-trained athlete. *Am J Cardiol.* 1977;40(4):528-33.
35. Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif J-C, et al. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation.* 2011;123(1):13-22.
36. Urpi-Sarda M, Ramiro-Puig E, Khan N, Ramos-Romero S, Llorach R, Castell M, et al. Distribution of

epicatechin metabolites in lymphoid tissues and testes of young rats with a cocoa-enriched diet. *Br J Nutr.* maig 2010;103(10):1393-7.

37. Ramiro-Puig E, Urpí-Sardà M, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castellote C, Andrés-Lacueva C, et al. Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *J Agric Food Chem.* 2007;55(16):6431-8.
38. Sarjan HN, Yajurvedi HN. Duration dependent effect of chronic stress on primary and secondary lymphoid organs and their reversibility in rats. *Immunobiology.* 2019;224(1):133-41.
39. Tortora GJ, Derrickson B. *Principios de anatomía y fisiología.* 15 ed. Ciudad de México. Editorial Médica Panamericana; 2018. 1236 p.
40. Jain M, Parmar HS. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflamm Res.* 2011;60(5):483-91.

8 Annexos

8.1 Annex I

Autor i any	R/r, ♀/♂, edat	Flavonoide	Dosi	VO/P	Durada	Exercici (T/N/Ro)	Efecte
Davis et al., 2009 (1)	r, ♂, 8 setmanes	Quercetina	12,5 o 25 mg/kg	VO	7 dies	T, TTE	↑
Lin et al., 2014 (2)	R, ♂, NE	Quercetina	25 o 50 o 75 mg/kg	VO	2 setmanes	S, TTE	↑
Casuso et al., 2013 (3)	R, ♂, 3 setmanes	Quercetina	25 mg/kg	VO	6 setmanes	T, TTE (TI)	=
Wu et al., 2019 (4)	R, ♂, 6 setmanes	Miricetina	50 o 150 mg/kg	VO	2 o 4 setmanes	T, TTE	↑
Zou et al., 2015 (5)	R, ♂, NE	Miricetina	50 o 75 o 100 mg/kg	VO	7 dies	T, TTE (hipòxia)	↑
Jung et al., 2017 (6)	r, ♂, 7 setmanes	Miricetina	50 mg/kg	VO	3 setmanes	T, TTE	↑
Su et al., 2014 (7)	r, ♂, 5 setmanes	Rutina	15 o 30 o 60 mg/kg	VO	7 dies	N, TTE	↑
Zamanian et al., 2017a (8)	R, ♂, 12 setmanes	Troxerutina	75 o 150 o 300 mg/kg	VO	30 dies	N, TTE	↑
Nogueira et al., 2011 (9)	r, ♂, 12 mesos	(-) epicatequina	1 mg/kg	VO	15 dies	T, TTE (TI)	↑
Copp et al., 2013 (10)	R, ♂, 4 mesos	(-) epicatequina	2 mg/kg	VO	21 dies	T, TTE (TI)	=
Hütteman et al., 2012 (11)	r, ♂, 5 mesos	(-) epicatequina	2 mg/kg	VO	2 setmanes	T, TTE (TI)	↑
Sachdeva et al., 2011 (12)	R, ♂, NE (adultes)	EGCG	50 o 100 mg/kg	VO	30 min abans ex	N, TTE	↑
Bhattacharya et al., 2015 (13)	r, ♂, 10 mesos	EGCG	1,5 mg en 1 g pinso	Pinso	39 dies	T, TTE	=
Pence et al., 2017 (14)	r, ♂, 6-7 mesos	EGCG	1,7 mg en 1g pinso	Pinso	6 mesos	T, TTE (TI)	↓
Haramizu et al., 2013 (15)	r, ♂, 6 setmanes	Catequines té verd	0,5% w/w	Pinso	3 setmanes	T, TTE	↑
Murase et al., 2008 (16)	r, ♂, 19 setmanes	Catequines té verd	0,35% w/w	Pinso	10 setmanes	T, TTE	↑
Murase et al., 2006 (17)	r, ♂, 6 setmanes	Catequines té verd	0,2 o 0,5 w/w	Pinso	10 setmanes	T, TTE	↑
Murase et al., 2005 (18)	r, ♂, 4 setmanes	Catequines té verd	0,2 o 0,5 w/w	Pinso	10 setmanes	N, TTE	↑
Matsukawa et al., 2017 (19)	r, ♂, 5 setmanes	Cianidina glucosilada	1 mg/kg	VO	15 dies	N, TTE	↑
Duan et al., 2017 (20)	R, ♂, 20-22 setmanes	Luteloïna	25 o 50 o 75 mg/kg	VO	3 setmanes	N, TTE	↑

Kou et al., 2018 (21)	r, ♂, 6-7 setmanes	Tangeretina	25 o 50 o 100 mg/kg	VO	3 setmanes	Ro, TTE	↑
Zamanian et al., 2017b (22)	R, ♀, 9 setmanes	Naringenina	40 o 80 o 160 mg/kg	VO	30 dies	N, TTE	↑
Estruel-Amades et al., 2019 (23)	R, ♀, 3 setmanes	Hesperidina	200 mg/kg	VO	5 setmanes	T, TTE (TI)	↑
Shang et al., 2010 (24)	r, ♂, NE	Glabridina	5 o 10 o 20 mg/kg	VO	28 dies	N, TTE	↑
Yu et al., 2010 (25)	R, ♂, NE	Rutina, catequina, isoquercetina	0,5 o 1 o 2 mg/kg	VO	10 dies	N, TTE	↑
Veskoukis et al., 2012 (26)	R, ♂, 9 setmanes	Flavonoides raïm	300 mg/kg	VO	1 dia	N, TTE	=
Xiaoming et al., 2010 (27)	r, ♂, 6 setmanes	Dadzeïna i rutina	25 o 50 o 75 mg/kg	VO	5 setmanes	N, TTE	↑

Taula. Resum de les característiques dels estudis pre-clínic. Rata (R), ratolí (r), femelles (♀), mascles (♂), via oral (VO), pinso (P), treadmill (T), nedar (N), roda (Ro), Epigallocatequina-3-galat (EGCG), mil·ligrams / quilogram pes corporal (mg/kg), entrenar fins a cansament (TTE), test incremental (TI), efecte positiu sobre el rendiment (↑), no té efecte sobre el rendiment (=), efecte negatiu sobre el rendiment (↓). En blau l'estudi que inclou l'efecte de l'administració dels flavonoides sobre la immunosupressió induïda per l'exercici.

8.2 Annex II

Autor i any	Disseny d'estudi	#♀/♂AF	Edat (anys)	Flavonoide	Dosi	Durada	Exercici	Efecte
Nieman et al., 2010 (28)	Cross-over	30♂ S	20,2	Quercetina	1000 mg	2 setmanes	T, 12 min TT	↑
MacRae et al., 2006 (29)	Cross-over	11♂ E	NE	Quercetina	300 mg	6 setmanes	B, 30 km TT	↑
Cureton et al., 2009 (30)	Cross-over	30♂ A	23,1 / 22,1	Quercetina	1000 mg	9-16 dies	B, 10 min TT	=
Cheuvront et al., 2009 (31)	Cross-over	10♂ A	23	Quercetina	2000 mg	2 h abans ex	B, 15 min TT	=
Askari et al., 2013 (32)	Paral·lel	11♂ E	20,93 / 21,5 / 21,21 / 20,46	Quercetina	250 o 500 mg	8 setmanes	T, Bruce protocol	=
Bigelman et al., 2010 (33)	Paral·lel	44♂ i 14♀ E	22 / 20,3	Quercetina	250 mg	6 setmanes	APFT	=
Davis et al., 2010 (34)	Cross-over	7♂ i 5♀ A	22,9	Quercetina	500 mg	4 setmanes	TTE al 75% VO2max	↑
Scholten et al., 2015 (35)	Paral·lel	40♂ A	29,9 / 32,8 / 30,3 / 32,3	Quercetina	1000 mg	8 setmanes	T, 5 km TT	=
Riva et al., 2018 (36)	Paral·lel	32♂ i 16♀ E	33	Quercetina	500 mg	2 setmanes	750 m N, 20 km B, 5 km T	↑
Daneshvar et al., 2013 (37)	Paral·lel	26♂ A	17,5 / 17	Quercetina	1000 mg	8 setmanes	B, 14 min TT	↑
Darvishi et al., 2013 (38)	Paral·lel	26♀ A	16,1 / 15,7	Quercetina	1000 mg	8 setmanes	B, 14 min TT	=
Ganio et al., 2010 (39)	Cross-over	5♂ i 6♀ S	19,8	Quercetina	1000 mg	22 dies	T, TTE test incremental	=
Nieman et al., 2007a (40) Henson et al., 2008 (41) *	Paral·lel	32♂ i 7♀ E	44,2 / 46	Quercetina	1000 mg	3 setmanes	T, 160 km	=
Nieman et al., 2009 (42)	Paral·lel	32♂ i 7♀ E	26,3 / 26,8 / 28,1	Quercetina	1000 mg	2 set abans i 1set després	B, 5 i 10 i 20 km TT	=
Nieman et al., 2007b (43) Nieman et al., 2007c (44) *	Paral·lel	40♂ E	26,1 / 29,1	Quercetina	1000 mg	24 dies	B, 3 h TT	=

Konrad et al., 2011 (45)	Cross-over	11♂ i 9♀ E	38,4	Quercetina	1000 mg	15 min abans	T, 15 min TT	=
Grabs et al., 2017 (46)	Paral·lel	138 ♂	44 / 40	Rutòsid	600-1200 mg	1 set abans i 2 set després	T, 42,2 km	=
Cook et al., 2015 (47)	Cross-over	14♂ E	38	Antocianines (BC)	105 mg	7 dies	B, 16,1 km TT	↑
Braakhuis et al., 2014 (48)	Cross-over	23♀ E	31	Antocianines (BC)	105 mg	3 setmanes	T, 5 km TT	=
Godwin et al., 2017 (49)	Cross-over	9♂ E i 15♂ A	17/20	Antocianines (BC)	105 mg	7 dies	T, 6 sprints 35 m	=
Murphy et al., 2017 (50)	Cross-over	10♂ E	30	Antocianines (BC)	105 mg	7 dies	B, 2x 4 km TT	↑
Perkins et al., 2015 (51)	Cross-over	13♂ A	25	Antocianines (BC)	105 mg	7 dies	T, número d'sprints	↑
Willems et al., 2016 (52)	Cross-over	13♂ A	22	Antocianines (BC)	105 mg	7 dies	T. LIST	=
Skarpanska-Stejnborn et al., 2006 (53)	Paral·lel	19♂ E	20,1 / 20,9	BC	750 mg	6 setmanes	Re, 2 km TT	=
Skarpanska-Stejnborn et al., 2017 (54)	Paral·lel	16♂ E	21,3	Proantocianidines (nabiu)	72 mg	6 setmanes	Re, 2 km TT	=
Stellingwerf et al., 2014 (55)	Cross-over	16♂ E	30	Flavonoides cacau	262 mg	2 h abans	B, 15 min TT	=
Pescheck et al., 2013 (56)	Cross-over	8♂ E	24,6	Flavonoides cacau	350 mg	1-2h després	T, 5 km TT	=
Allgrove et al., 2011 (57)	Cross-over	20♂ A	22	Flavonoides cacau	197 mg	2 setmanes	B, TTE	=
Patel et al., 2015 (58)	Cross-over	9♂ A	21	Flavonoides cacau	259 mg	14 dies	B, 2 min TT	↑
Taub et al., 2016 (59)	Paral·lel	17♂ S	49,5 / 49,8	Flavonoides cacau	175 mg	3 mesos	B, test VO ₂ max	↑
Decroix et al., 2017 (60)	Cross-over	12♂ E	30	Flavonoides cacau	900 mg	1,5 i 3 h abans	B, 30 min TT	=
Garcia-Merino et al., 2020 (61)	Paral·lel	30 ♂ E	33 / 36	Flavonols del cacau	425 mg	10 setmanes	T, 1 km	=
Giolo et al., 2019 (62)	Paral·lel	13 ♂ E	20,69	Flavonols del cacau	308 mg	7 dies	T, Yo-yo performance test	=
Keane et al., 2018 (63)	Cross-over	10 ♂ E	28	Concentrat (TC)	60 mL	2 setmanes	T, TTE	=

Morgan et al., 2019 (64)	Cross-over	8 ♂ E	19,7	Antocianines (TC)	256 mg	7 dies	B, 15 km TT	↑
Levers et al., 2016 (65)	Paral·lel	18♂ i 9♀ E	21,8	Antocianines (TC)	66 mg	10 dies	T, 21,1 km	↑
McCormick et al., 2016 (66)	Cross-over	9 ♂ E	18,6	Antocianines (TC)	273 mg	6 dies	N, repeated swim test	=
Bell et al., 2016 (67)	Paral·lel	16 ♂ E	25	Antocianines (TC)	73 mg	4 dies abans i 3 dies després	T, sprint	=
Bell et al., 2014 (68)	Paral·lel	16 ♂ E	30	Antocianines (TC)	273 mg	1 setmana	B, 5 min TT	=
Clifford et al., 2013 (69)	Cross-over	9 ♂ E	32,1	Polifenols (TC)	216 mg	3 dies	B, 20 km TT	=
Kuo et al., 2015 (70)	Paral·lel	14 ♂ S	20	EGCG	250 mg	4 setmanes	T, Bruce protocol	=
Roberts et al., 2015 (71)	Paral·lel	14 ♂ A	21,4	EGCG	400 mg	4 setmanes	T, 40 min TT	↑
Dean et al., 2009 (72)	Cross-over	8 ♂ E	36,4	EGCG	270 mg	6 dies	B, 40 km TT	=
Eichenberger et al., 2010 (73)	Cross-over	9 ♂ E	32,2	Catequines té verd	159 mg	3 setmanes	B, 30 min TT	=
Ota et al., 2016 (74)	Cross-over	9 ♂ A	33,9	Catequines del té verd	570 mg	8 setmanes	B, TI	↑
Martin et al., 2014 (75)	Cross-over	15 ♂ A	24	Catequines del té verd	1000 mg	2 dies	B, 250 kJ TT	=
Crum et al., 2017 (76)	Cross-over	7♂ i 1♀ E	17 - 18	Extracte de magrana	1000 mg	2,5 h abans	B, TTE	=
Trexler et al., 2014 (77)	Cross-over	10♂ i 9♀ A	22,2	Extracte de magrana	1000 mg	30 min abans	T, TTE	↑
Roelofs et al., 2017 (78)	Cross-over	8 ♂ i 11♀ E	22,1	Extracte de magrana	1000 mg	30 min abans	B, sprint	=
Trinity et al., 2014 (79)	Cross-over	8 ♂ E	26,8	Polifenols magrana	1 L	7 dies	B, TTE	=
Overdevest et al., 2018 (80)	Paral·lel	39 ♂ E	23	Flavonoides dels cítrics	500 mg	4 setmanes	B, TTE 10 min	↑

Martínez-Noguera et al., 2019 (81)	Cross-over	15 ♂ E	33,3	Hesperidina	500 mg	5 h abans	B, TI	=
Kang et al., 2012 (82)	Paral·lel	38 ♂ A	24,6 / 23,9 / 22,9	Flavonoides litxi	200 mg	1 mes	T, TTE	↑

Taula. Resum de les característiques dels estudis clínics. Número de persones (#), dones (♀), homes (♂), activitat física (AF): sedentaris (S), entrenats (E); actius (A); Blackcurrant, grosella negra (BC), tart cherry, cirera àcida (TC), epigallocatequina-3-galat (EGCG), mil·ligrams (mg), mil·lilitres (mL), litres (L); hores (h) exercici: treadmill/córrer (T), nedar (N), bicicleta (B), rem (Re), període de prova (TT), entrenar fins l'esgotament (TTE), test incremental (TI), diferents tipus de proves físiques: army physical fitness (APFT), maximal oxygen uptake, velocitat màxima del consum d'oxigen (VO_2 max), Loughborough Intermittent Shuttle Test (LIST); efecte positiu sobre el rendiment (↑), no té efecte sobre el rendiment (=), no especificat (NE). En blau els estudis que inclouen l'efecte de l'administració dels flavonoides sobre la immunosupressió induïda per l'exercici. * La mateixa intervenció, en una publicació es fa referència al rendiment físic i a l'altre els canvis immunològics.

8.3 Bibliografia

1. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:1071-7.
2. Lin Y, Liu HL, Fang J, Yu CH, Xiong YK, Yuan K. Anti-fatigue and vasoprotective effects of quercetin-3-O-gentiobiose on oxidative stress and vascular endothelial dysfunction induced by endurance swimming in rats. *Food Chem Toxicol.* 2014;68:290-6.
3. Casuso RA, Martínez-Amat A, Martínez-López EJ, Camiletti-Moirón D, Porres JM, Aranda P. Ergogenic effects of quercetin supplementation in trained rats. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10:1-7.
4. Wu L, Ran L, Lang H, Zhou M, Yu L, Yi L, et al. Myricetin improves endurance capacity by inducing muscle fiber type conversion via miR-499. *Nutr Metab.* 2019;16:1-13.
5. Zou D, Liu P, Chen K, Xie Q, Liang X, Bai Q, et al. Protective effects of myricetin on acute hypoxia-induced exercise intolerance and mitochondrial impairments in rats. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124727.
6. Jung HY, Lee D, Ryu HG, Choi BH, Go Y, Lee N, et al. Myricetin improves endurance capacity and mitochondrial density by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Sci Rep.* 2017;7:1-10.
7. Su KY, Yu CY, Chen YW, Huang YT, Chen CT, Wu HF, et al. Rutin, a flavonoid and principal component of *Saussurea involucreta*, attenuates physical fatigue in a forced swimming mouse model. *Int J Med Sci.* 2014;11(5):528-37.
8. Zamanian M, Hajizadeh MR, Esmaili A, Shamsizadeh A, Allahtavakoli M. Antifatigue effects of troxerutin on exercise endurance capacity, oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 levels in trained male rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2017;31(4):447-55.
9. Nogueira L, Ramirez-Sanchez I, Perkins GA, Murphy A, Taub PR, Ceballos G, et al. (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J Physiol.* 2011;589(18):4615-31.
10. Copp SW, Inagaki T, White MJ, Hirai DM, Ferguson SK, Holdsworth CT, et al. (-)-Epicatechin administration and exercising skeletal muscle vascular control and microvascular oxygenation in healthy rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2013;304(2):H206-214.
11. Hüttemann M, Lee I, Malek MH. (-)-Epicatechin maintains endurance training adaptation in mice after 14 days of detraining. *FASEB J.* 2012;26(4):1413-22.
12. Sachdeva AK, Kuhad A, Chopra K. Epigallocatechin gallate ameliorates behavioral and biochemical deficits in rat model of load-induced chronic fatigue syndrome. *Brain Res Bull.* 2011;86(3-4):165-72.
13. Bhattacharya TK, Pence BD, Ossyra JM, Gibbons TE, Perez S, McCusker RH, et al. Exercise but not (-)-epigallocatechin-3-gallate or β -alanine enhances physical fitness, brain plasticity, and behavioral performance in mice. *Physiol Behav.* 2015;145:29-37.
14. Pence BD, Bhattacharya TK, Park P, Rytch JL, Allen JM, Sun Y, et al. Long-term supplementation with EGCG and beta-alanine decreases mortality but does not affect cognitive or muscle function in

aged mice. *Exp Gerontol.* 2017;98:22-9.

15. Haramizu S, Ota N, Hase T, Murase T. Catechins suppress muscle inflammation and hasten performance recovery after exercise. *Med Sci Sport Exerc.* 2013;45(9):1694-702.
16. Murase T, Haramizu S, Ota N, Hase T. Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppresses the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerated mice. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2008;295(1):R281-9.
17. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I, Hase T. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(6):R1550-6.
18. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Nagasawa A, Tokimitsu I. Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(3):R708-15.
19. Matsukawa T, Motojima H, Sato Y, Takahashi S, Villareal MO, Isoda H. Upregulation of skeletal muscle PGC-1 α through the elevation of cyclic AMP levels by cyanidin-3-glucoside enhances exercise performance. *Sci Rep.* 2017;7:1-12.
20. Duan F, Guo Y, Li J, Yuan K. Antifatigue effect of luteolin-6-C-neohesperidoside on oxidative stress injury induced by forced swimming of rats through modulation of Nrf2/ARE signaling pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;Article 3159358.
21. Kou G, Li Z, Wu C, Liu Y, Hu Y, Guo L, et al. Citrus tangeretin improves skeletal muscle mitochondrial biogenesis via activating the AMPK-PGC1- α pathway in vitro and in vivo: a possible mechanism for its beneficial effect on physical performance. *J Agric Food Chem.* 2018;66:11917-25.
22. Zamanian M, Hajizadeh M, Shamsizadeh A, Moemenzadeh M, Amirteimouri M, Elshiekh M, et al. Effects of naringin on physical fatigue and serum MMP-9 concentration in female rats. *Pharm Biol.* 2017;55(1):423-7.
23. Estruel-Amades S, Massot-Cladera M, Garcia-Cerdà P, Pérez-Cano FJ, Franch À, Castell M, et al. Protective effect of hesperidin on the oxidative stress induced by an exhausting exercise in intensively trained rats. *Nutrients.* 2019;11(4):1-17.
24. Shang H, Cao S, Wang J, Zheng H, Putheti R. Glabridin from chinese herb licorice inhibits fatigue in mice. *African J Tradit Complement Altern Med.* 2010;7(1):17-23.
25. Yu F-R, Liu Y, Cui Y-Z, Chan E-Q, Xie M-R, Mcguire PP, et al. Effects of a flavonoid extract from *Cynomorium songaricum* on the swimming endurance of rats. *Am Jorunal Chinese Meidine.* 2010;38(1):65-73.
26. Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, Stagos D, Aligiannis N, Halabalaki M, et al. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;Article 185867.
27. Xiaoming W, Ling L, Jinghang Z. Antioxidant and anti-fatigue activities of flavonoids from *Puerariae*

Radix. *African J Tradit Complement Altern Med.* 2012;9(2):221-7.

28. Nieman DC, Williams AS, Shanely RA, Jin F, Manculty SR, Triplett NT, et al. Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sport Exerc.* 2010;42(2):338-45.
29. MacRae H, Mefferd K. Dietary antioxidant supplementation combined with quercetin improves cycling time trial performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2006;16:405-19.
30. Cureton KJ, Tomporowski PD, Singhal A, Pasley JD, Bigelman KA, Lambourne K, et al. Dietary quercetin supplementation is not ergogenic in untrained men. *J Appl Physiol.* 2009;107:1095-104.
31. Chevront SN, Ely BR, Kenefick RW, Michniak-Kohn BB, Rood JC, Sawka MN. No effect of nutritional adenosine receptor antagonists on exercise performance in the heat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:394-401.
32. Askari G, Ghasvand R, Paknahad Z, Karimian J, Rabiee K, Sharifirad G, et al. The effects of quercetin supplementation on body composition, exercise performance and muscle damage indices in athletes. *Int J Prev Med.* 2013;4(1):21-6.
33. Bigelman KA, Fan EH, Chapman DP, Freese EC, Trilk JL, Cureton KJ. Effects of six weeks of quercetin supplementation on physical performance in ROTC Cadets. *Mil Med.* 2010;175(10):791-8.
34. Davis JM, Carlstedt CJ, Chen S, Carmichael MD, Murphy EA. The dietary flavonoid quercetin increases VO₂max and endurance capacity. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2010;20(1):56-62.
35. Scholten S, Sergeev I, Birger C, Song Q. Effects of vitamin D and quercetin, alone and in combination, on cardiorespiratory fitness and muscle function in physically active male adults. *Open Access J Sport Med.* 2015;6:229-39.
36. Riva A, Vitale J, Belcaro G, Feragalli B, Vinciguerra G, Cacchio M, et al. Quercetin phytosome® in triathlon athletes: a pilot registry study. *Minerva Med.* 2018;109(4):285-9.
37. Daneshvar P, Hariri M, Ghasvand R, Askari G, Darvishi L, Mashhadi NS, et al. Effect of eight weeks of quercetin supplementation on exercise performance, muscle damage and body muscle in male badminton players. *Int J Prev Med.* 2013;4(Suppl 1):S53-7.
38. Darvishi L, Ghasvand R, Hariri M, Askari G, Rezai P, Aghaie M, et al. Quercetin supplementation does not attenuate exercise performance and body composition in young female swimmers. *Int J Prev Med.* 2013;4(Suppl 1):S43-7.
39. Ganio MS, Armstrong LE, Johnson EC, Klau JF, Ballard KD, Michniak-Kohn B, et al. Effect of quercetin supplementation on maximal oxygen uptake in men and women. *J Sports Sci.* 6 gener 2010;28(2):201-8.
40. Nieman DC, Henson DA, Davis JM, Dumke CL, Gross SJ, Jenkins DP, et al. Quercetin ingestion does not alter cytokine changes in athletes competing in the Western States Endurance Run. *J Interf cytokine Res.* 2007;27:1003-11.

41. Henson D, Nieman D, Davis JM, Dumke C, Gross S, Murphy A, et al. Post-160-km race illness rates and decreases in granulocyte respiratory burst and salivary IgA Output are not countered by quercetin ingestion. *Int J Sports Med.* 2008;29(10):856-63.
42. Nieman DC, Henson DA, Maxwell KR, Williams AS, Mcanulty SR, Jin F, et al. Effects of quercetin and EGCG on mitochondrial biogenesis and immunity. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(7):1467-75.
43. Nieman DC, Henson DA, Davis JM, Angela Murphy E, Jenkins DP, Gross SJ, et al. Quercetin's influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and muscle and leukocyte cytokine mRNA. *J Appl Physiol.* 2007;103(5):1728-35.
44. Nieman DC, Henson DA, Gross SJ, Jenkins DP, Davis JM, Murphy EA, et al. Quercetin reduces illness but not immune perturbations after intensive exercise. *Med Sci Sport Exerc.* 2007;39(9):1561-9.
45. Konrad M, Nieman DC, Henson DA, Kennerly KM, Jin F, Wallner-Liebmann SJ. The acute effect of ingesting a quercetin-based supplement on exercise-induced inflammation and immune changes in runners. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2011;21(4):338-46.
46. Grabs V, Kersten A, Haller B, Braun S, Nieman DC, Halle M, et al. Rutoside and hydrolytic enzymes do not attenuate marathon-induced inflammation. *Med Sci Sports Exerc.* 2017;49(3):387-95.
47. Cook MD, Myers SD, Blacker SD, Willems MET. New Zealand blackcurrant extract improves cycling performance and fat oxidation in cyclists. *Eur J Appl Physiol.* 2015;115(11):2357-65.
48. Braakhuis AJ, Hopkins WG, Lowe TE. Effects of dietary antioxidants on training and performance in female runners. *Eur J Sport Sci.* 17 febrer 2014;14(2):160-8.
49. Godwin C, Cook M, Willems M. Effect of New Zealand blackcurrant extract on performance during the running based anaerobic sprint test in trained youth and recreationally active male football players. *Sports.* 2017;5(3):2-10.
50. Murphy C, Cook M, Willems M. Effect of New Zealand blackcurrant extract on repeated cycling time trial performance. *Sports.* 2017;5(2):1-6.
51. Perkins IC, Vine SA, Blacker SD, Willems MET. New Zealand blackcurrant extract improves high-intensity intermittent running. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2015;25(5):487-93.
52. Willems M, Cousins L, Williams D, Blacker S. Beneficial effects of New Zealand blackcurrant extract on maximal sprint speed during the Loughborough Intermittent Shuttle Test. *Sports.* 2016;4(3):1-10.
53. Skarpańska-Stejnborn A, Basta P, Pilaczyńska-Szcześniak Ł. The influence of supplementation with the black currant (*Ribes nigrum*) extract on selected prooxidative-antioxidative balance parameters in rowers. *Stud Phys Cult Tour.* 2006;13(2):51-8.
54. Skarpańska-Stejnborn A, Basta P, Trzeciak J, Michalska A, Kafkas ME, Woitas-Ślubowska D. Effects of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) supplementation on iron status and inflammatory markers in rowers. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017;14:1-10.
55. Stellingwerff T, Godin J-P, Chou CJ, Grathwohl D, Ross AB, Cooper KA, et al. The effect of acute dark

chocolate consumption on carbohydrate metabolism and performance during rest and exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(2):173-82.

56. Peschek K, Pritchett R, Bergman E, Pritchett K. The effects of acute post exercise consumption of two cocoa-based beverages with varying flavanol content on indices of muscle recovery following downhill treadmill running. *Nutrients.* 2013;6(1):50-62.
57. Allgrove J, Farrell E, Gleeson M, Williamson G, Cooper K. Regular dark chocolate consumption's reduction of oxidative stress and increase of free-fatty-acid mobilization in response to prolonged cycling. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2011;21(2):113-23.
58. Patel RK, Brouner J, Spendiff O. Dark chocolate supplementation reduces the oxygen cost of moderate intensity cycling. *J Int Soc Sports Nutr.* 2015;12:1-8.
59. Taub PR, Ramirez-Sanchez I, Patel M, Higginbotham E, Moreno-Ulloa A, Román-Pintos LM, et al. Beneficial effects of dark chocolate on exercise capacity in sedentary subjects: underlying mechanisms. A double blind, randomized, placebo controlled trial. *Food Funct.* 2016;7(9):3686-93.
60. Decroix L, Tonoli C, Soares DD, Descat A, Drittij-Reijnders MJ, Weseler AR, et al. Acute cocoa flavanols intake has minimal effects on exercise-induced oxidative stress and nitric oxide production in healthy cyclists: a randomized controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017;14:1-11.
61. García-Merino JÁ, Moreno-Pérez D, De Lucas B, Montalvo-Lominchar MG, Muñoz E, Sánchez L, et al. Chronic flavanol-rich cocoa powder supplementation reduces body fat mass in endurance athletes by modifying the follistatin/ myostatin ratio and leptin levels. *Food Funct.* 2020;11(4):3441-50.
62. Giolo de Carvalho F, Garant Fisher M, Thornley TT, Roemer K, Pritchett R, Cristini de Freitas E, et al. Cocoa flavanol effects on markers of oxidative stress and recovery after muscle damage protocol in elite rugby players. *Nutrition.* 2019;62:47-51.
63. Keane KM, Bailey SJ, Vanhatalo A, Jones AM, Howatson G. Effects of montmorency tart cherry (*L. Prunus Cerasus*) consumption on nitric oxide biomarkers and exercise performance. *Scand J Med Sci Sport.* 2018;28(7):1746-56.
64. Morgan PT, Barton MJ, Bowtell JL. Montmorency cherry supplementation improves 15-km cycling time-trial performance. *Eur J Appl Physiol.* 2019;119(3):675-84.
65. Levers K, Dalton R, Galvan E, O'Connor A, Goodenough C, Simbo S, et al. Effects of powdered Montmorency tart cherry supplementation on acute endurance exercise performance in aerobically trained individuals. *J Int Soc Sports Nutr.* 2016;13(1):1-23.
66. McCormick R, Peeling P, Binnie M, Dawson B, Sim M. Effect of tart cherry juice on recovery and next day performance in well-trained Water Polo players. *J Int Soc Sports Nutr.* 2016;13:1-8.
67. Bell PG, Stevenson E, Davison GW, Howatson G. The effects of montmorency tart cherry concentrate supplementation on recovery following prolonged, intermittent exercise. *Nutrients.* 2016;8:1-11.
68. Bell PG, Walshe IH, Davison GW, Stevenson E, Howatson G. Montmorency cherries reduce the oxidative stress and inflammatory responses to repeated days high-intensity stochastic cycling.

Nutrients. 2014;6(2):829-43.

69. Clifford T, Mitchell N, Scott A. The influence of different sources of polyphenols on sub- maximal cycling and time trial performance. *J Athl Enhanc.* 2013;2(6):S10.
70. Kuo Y-C, Lin J-C, Bernard JR, Liao Y-H. Green tea extract supplementation does not hamper endurance-training adaptation but improves antioxidant capacity in sedentary men. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015;40(10):990-6.
71. Roberts JD, Roberts MG, Tarpey MD, Weekes JC, Thomas CH. The effect of a decaffeinated green tea extract formula on fat oxidation, body composition and exercise performance. *J Int Soc Sports Nutr.* 2015;12:1-9.
72. Dean S, Braakhuis A, Paton C. The effects of EGCG on fat oxidation and endurance performance in male cyclists. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2009;19(6):624-44.
73. Eichenberger P, Mettler S, Arnold M, Colombani PC. No effects of three-week consumption of a green tea extract on time trial performance in endurance-trained men. *Int J Vitam Nutr Res.* 2010;80(1):54-64.
74. Ota N, Soga S, Shimotoyodome A. Daily consumption of tea catechins improves aerobic capacity in healthy male adults: a randomized double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(12):2412-7.
75. Martin BJ, Tan RB, Gillen JB, Percival ME, Gibala MJ. No effect of short-term green tea extract supplementation on metabolism at rest or during exercise in the fed state. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2014;24(6):656-64.
76. Crum EM, Che Muhamed AM, Barnes M, Stannard SR. The effect of acute pomegranate extract supplementation on oxygen uptake in highly-trained cyclists during high-intensity exercise in a high altitude environment. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017;14:1-9.
77. Trexler ET, Smith-Ryan AE, Melvin MN, Roelofs EJ, Wingfield HL. Effects of pomegranate extract on blood flow and running time to exhaustion. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(9):1038-42.
78. Roelofs EJ, Smith-Ryan AE, Trexler ET, Hirsch KR, Mock MG. Effects of pomegranate extract on blood flow and vessel diameter after high-intensity exercise in young, healthy adults. *Eur J Sport Sci.* 2017;17(3):317-25.
79. Trinity JD, Pahnke MD, Trombold JR, Coyle EF. Impact of polyphenol antioxidants on cycling performance and cardiovascular function. *Nutrients.* 2014;6(3):1273-92.
80. Overdevest E, Wouters JA, Wolfs KHM, Van Leeuwen JJM, Possemiers S. Citrus flavonoid supplementation improves exercise performance in trained athletes. *J Sport Sci Med.* 2018;17(1):24-30.
81. Martínez-Noguera FJ, Marín-Pagán C, Carlos-Vivas J, Rubio-Arias JA, Alcaraz PE. Acute effects of hesperidin in oxidant/antioxidant state markers and performance in amateur cyclists. *Nutrients.* 2019;11(8):1-20.

82. Kang SW, Hahn S, Kim JK, Yang SM, Park BJ, Lee SC. Oligomerized lychee fruit extract (OLFE) and a mixture of vitamin C and vitamin E for endurance capacity in a double blind randomized controlled trial. *J Clin Biochem Nutr.* 2012;50(2):106-13.