

Biomédica 2008;28:298-304

COMUNICACIÓN BREVE

Acción *in vitro* de la cafeína en anillos de arteria mamaria interna utilizada en cirugía de revascularización cardiaca

Darío Echeverri, Félix R. Montes, Alexandra Delgadillo, Marcela Beltrán, Lorena Buitrago

Laboratorio de Investigación en Función Vascular, Fundación Cardioinfantil, Instituto de Cardiología, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El efecto vasodilatador de la cafeína en las arterias de modelos animales ya ha sido demostrado. Se desconocen estudios con la misma metodología *in vitro* utilizando arterias humanas.

Objetivos. Evaluar los efectos vasoactivos *in vitro* de la cafeína en la arteria mamaria interna de humanos.

Materiales y métodos. Se utilizaron 80 anillos de arteria mamaria interna (n=20 pacientes). La funcionalidad del endotelio se evaluó con acetilcolina a una concentración de $3,16 \times 10^{-6}$ M, de nitroglicerina con dosis acumulativas de 10^{-11} M a 10^{-4} M y de cafeína con concentraciones acumulativas de 10^{-8} M a 10^{-4} M.

Resultados. La nitroglicerina indujo un porcentaje máximo de relajación de $87,4 \pm 12,3\%$, la cafeína, de $86,9 \pm 21,0\%$ en arterias con endotelio funcional y de $71,6 \pm 28,6\%$ en arterias con disfunción endotelial. No se encontraron diferencias entre los tres grupos ($p=0,289$). Tampoco se encontraron diferencias en la EC_{50} en arterias con endotelio funcional ($1,66 \times 10^{-5} \pm 1,57 \times 10^{-5}$ M) y arterias disfuncionales ($7,75 \times 10^{-5} \pm 14,64 \times 10^{-5}$ M). La nitroglicerina resultó más potente que la cafeína ($EC_{50} = 4,30 \times 10^{-9} \pm 4,35 \times 10^{-9}$ M) ($p=0,013$).

Conclusiones. Aunque la nitroglicerina fue un vasodilatador más potente, la cafeína tuvo un fuerte efecto vasodilatador arterial *in vitro* independientemente de la funcionalidad del endotelio en arterias humanas.

Palabras clave: cafeína/uso terapéutico, revascularización miocárdica, vasodilatación, aorta, aterosclerosis, endotelio, acetilcolina.

***In vitro* effect of caffeine on internal mammary artery rings used in cardiac revascularization surgery**

Introduction. The vasodilator effect of caffeine in animal models arteries has been demonstrated previously. However, studies with the same methodology using human arteries *in vitro* have not been performed.

Objectives. The *in vitro* vasoactive effects of caffeine was evaluated on human internal mammary arteries.

Materials and methods. Internal mammary artery rings were used (n=20). Endothelial function was evaluated with acetylcholine at a concentration of 3.16×10^{-6} M, nitroglycerine at cumulative concentrations of 10^{-11} M to 10^{-4} M and caffeine with cumulative concentrations of 10^{-8} M to 10^{-4} M.

Results. Nitroglycerin produced a maximum relaxation percentage of $87.4 \pm 12.3\%$, caffeine a percentage of $86.9 \pm 21.0\%$ in arteries with functional endothelium, and of $71.6 \pm 28.6\%$ in arteries with endothelial dysfunction. No differences were detected among the three groups ($p=0.289$). Similarly, no differences were found between EC_{50} in arteries with functional endothelium ($1.66 \times 10^{-5} \pm 1.57 \times 10^{-5}$ M) and dysfunctional arteries ($7.8 \times 10^{-5} \pm 14.6 \times 10^{-5}$ M). Nitroglycerine proved more potent than caffeine ($EC_{50} = 4.3 \times 10^{-9} \pm 4.4 \times 10^{-9}$ M) ($p=0.013$).

Conclusions. Although nitroglycerin was a more potent vasodilator, caffeine had a strong arterial vasodilator effect regardless of endothelial function in human arteries.

Key words: caffeine/therapeutic use, myocardial revascularization, vasodilation, aorta, atherosclerosis, endothelium, acetylcholine.

El café es la bebida estimulante caliente más consumida en el mundo. La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es el principio activo más conocido del café y ha sido estudiada en diferentes condiciones de salud física y mental (1,2). La relación entre consumo de café y salud cardiovascular ha sido motivo de interés durante décadas, y ha arrojado resultados contradictorios. Se ha descrito que el consumo de café podría afectar de manera adversa la presión arterial (3,4), el perfil de lípidos (4), los niveles de homocisteína (5), y favorecer la presencia de taquicardia y arritmias cardíacas (6,7) e, incluso, inducir a mayor incidencia de enfermedad coronaria sintomática (8). En contraste con esta información, otros estudios sugieren que el consumo de café podría tener efectos benéficos, o al menos no nocivos, sobre el sistema cardiovascular (9,10) y que los efectos adversos adjudicados a la cafeína pueden deberse a otros ingredientes del café diferentes a la cafeína (11).

En diferentes condiciones patológicas, la relajación vascular dependiente del endotelio es anormal (12) y se ha observado vasorreactividad arterial anormal en presencia de un compromiso de la función endotelial (13). Los estudios realizados en vasos sanguíneos humanos y de animales demostraron que la aterosclerosis reduce la relajación vascular obtenida con la acetilcolina (ACh) y el calcio ionóforo (14). Hasta ahora se ha descrito que la cafeína tiene un efecto vasodilatador en las arterias de ratas sanas (15-17) e hipertensas (17) y en las arterias de conejos sanos (18). Además, se ha encontrado que este efecto es independiente de la denudación *in vitro* del endotelio (15-17). En humanos, se conoce parcialmente la respuesta vascular a la cafeína. Sin embargo, se desconoce el efecto y la potencia

de la cafeína como vasodilatador en arterias humanas provenientes de pacientes con aterosclerosis.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos *in vitro* de la cafeína sobre la relajación vascular en anillos de arterias mamarias internas procedentes de pacientes con enfermedad coronaria grave sometidos a cirugía de revascularización miocárdica y determinar las diferencias en el efecto vasodilatador de la cafeína en presencia de función endotelial normal y disfunción endotelial.

Materiales y métodos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica de la institución. Se realizó un estudio experimental, aleatorio y controlado en segmentos obtenidos de arterias mamarias internas procedentes de pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica.

Estudio en pacientes

Ingresaron al estudio 20 pacientes mayores de 45 años con diagnóstico de enfermedad coronaria grave e indicación terapéutica de cirugía de revascularización coronaria. Se excluyeron los pacientes con infarto agudo del miocardio, los drogadictos y aquéllos en los que no se utilizaron las arterias mamarias internas.

Previo aceptación firmada del consentimiento informado del estudio, de cada paciente se obtuvo un segmento distal, inmediatamente después de la disección de la arteria mamaria interna, el cual se recogía en la sala de cirugía, se conservaba en solución de Krebs-Henseleit y se guardaba en frío (0 °F) para ser transportado al laboratorio para el estudio de la función vascular *in vitro*.

Preparación del tejido vascular

La preparación del segmento arterial para el estudio de relajación vascular *in vitro*, se realizó como ha sido descrito previamente (19). Se obtuvieron cuatro anillos de cada vaso, que fueron colocados en recipientes con solución de Krebs-Henseleit con la siguiente composición (en mM): NaCl, 117; KCl, 4,7; CaCl₂, 6,1; MgSO₄, 1,17; NaHCO₃, 24,9 y D-glucosa, 11, a un pH de 7,40±0,05. El

Correspondencia:

Darío Echeverri, Servicio de Hemodinamia, Laboratorio de Investigación en Función Vascular, Fundación Cardio-Infantil, Instituto de Cardiología, Calle 163A No. 13B-60, primer piso, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfonos: (571) 679 1192 y 667 2727, extensiones 1114 y 4322; fax: (571) 669 0382

decheverri@cardioinfantil.org,funcionvascular@cardioinfantil.org

Recibido: 12/07/07; aceptado:19/11/07

tiempo entre la obtención del tejido aórtico y su preparación fue de menos de 30 minutos.

Vasorreactividad arterial in vitro

Experimentos con anillos vasculares aislados. A partir del segmento de arteria mamaria interna de cada paciente, se obtuvieron cuatro anillos. Cada anillo fue suspendido entre dos asas de alambre en una cámara de vidrio en el equipo de baño de órganos, con 25 ml de solución de Krebs-Henseleit a 37 °C, aireada con O₂ al 95% y CO₂ al 5%. Las asas de alambre se conectaron a un transductor de fuerza (Kent-Scientific Corporation, Litchfield, CT) y los cambios de tensión isométrica se registraron utilizando el sistema PowerLab/4SP (ADInstruments, Mountain View, CA). En estudios previos realizados por nuestro laboratorio, se definió una tensión de reposo óptima de 2g.

Evaluación de la relajación vascular independiente de endotelio. Después de alcanzar una tensión de reposo de 2g, cada anillo se contrajo con norepinefrina (3,16x10⁻⁶ M). Para los cuatro anillos provenientes del segmento de arteria mamaria interna aislado de cada paciente, se utilizó un solo fármaco (cafeína o nitroglicerina). Los segmentos de arteria mamaria interna provenientes de 10 pacientes (40 anillos) se utilizaron para evaluar el efecto vasodilatador de la nitroglicerina utilizando concentraciones acumulativas de 10⁻¹¹ M a 10⁻⁴ M. Definimos el porcentaje de relajación máxima como el porcentaje obtenido con la dosis máxima del fármaco utilizado (nitroglicerina o cafeína). El 100% de relajación máxima se considera el grado de tensión en reposo existente antes de la administración de norepinefrina.

Relajación vascular con cafeína. Se utilizaron segmentos de arteria mamaria interna provenientes de 10 pacientes para determinar el efecto vasoactivo de la cafeína en arterias con endotelio funcional y con endotelio disfuncional. Para los cuatro anillos de cada segmento de arterias mamarías internas se comprobó la relajación dependiente de endotelio con acetilcolina (Ach) utilizando una única dosis de 3,16x10⁻⁶ M. Se definió como endotelio disfuncional los casos en los que los anillos tuvieron un porcentaje de relajación menor al 30% en presencia de acetilcolina (20).

Luego de este procedimiento, cada anillo se lavó con solución de Krebs, se ajustó nuevamente la tensión de reposo a 2g y se contrajo con norepinefrina (3,16x10⁻⁶ M). Una vez contraído, cada anillo fue sometido a dosis acumulativas de cafeína (de 3,16x10⁻⁹ M a 1x10⁻⁴ M). Los datos se promediaron para cada paciente y se utilizaron cinco segmentos de arteria mamaria interna con endotelio funcional y cinco segmentos con endotelio disfuncional.

Comparación entre fármacos. A partir de los resultados obtenidos para cada vasodilatador, se calculó la EC₅₀, la cual se define como la concentración del agente vasodilatador que causa un 50% de relajación. La EC₅₀ se determinó para cada curva de contracción-relajación por la siguiente ecuación (ajuste logístico de una curva):

$$E = MA^p / (A^p + K^p),$$

donde E es la respuesta, M es la máxima contracción (o relajación), A es la contracción, K es la concentración EC₅₀ y p es la pendiente del parámetro (21). A partir de esta ecuación, se calculó el valor medio EC₅₀±DE (desviación estándar) en cada grupo y para cada fármaco.

Fármacos

El bitartrato de norepinefrina, el clorhidrato de acetilcolina y la cafeína anhidra se obtuvieron de Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). La nitroglicerina se obtuvo de American Reagents Laboratories, Inc. (Shirley, NY, USA).

Análisis estadísticos

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Para los valores máximos de porcentaje de relajación se determinó la homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) y la distribución normal de los datos (Shapiro Wilk), y se encontró que se cumplían estos supuestos en todos los casos (p≥0,05). Los valores de EC₅₀ fueron normalizados utilizando el logaritmo de la concentración molar y, para determinar las diferencias en la EC₅₀ entre los tres grupos nitroglicerina, cafeína en arteria mamaria interna con endotelio funcional y cafeína en arteria mamaria interna con endotelio disfuncional, se realizó un ANOVA de una sola vía. Para todos los análisis

se realizaron pruebas *post hoc* de Games Howell para determinar los grupos entre los que se presentaban las diferencias. Esta prueba se realizó debido a que existía un tamaño de muestra diferente en cada grupo y un comportamiento en la desviación estándar mayor a lo esperado. El valor de la significación se estableció con un valor de $p \leq 0,05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS 10.5.

Resultados

Ingresaron al estudio 20 pacientes, catorce hombres y seis mujeres, con edad de $62,1 \pm 3,5$ años. Todos los pacientes presentaron enfermedad coronaria de varios vasos e hipertensión arterial. Además, 13 pacientes tenían antecedente de dislipidemia, seis tenían diabetes mellitus y uno era fumador activo.

Relajación vascular

El número total de anillos de arteria mamaria interna analizados fue de 80 (cuatro anillos por paciente) correspondientes a 20 pacientes. La nitroglicerina indujo un porcentaje de relajación máximo de $87,4 \pm 12,3\%$. La cafeína indujo una relajación de $86,9 \pm 21,0\%$ en anillos con endotelio funcional y de $71,6 \pm 28,3\%$ en anillos con endotelio disfuncional; no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos en el porcentaje de relajación máxima ($p=0,289$) (figura 1).

La EC_{50} obtenida con nitroglicerina fue $4,30 \times 10^{-9} \pm 4,35 \times 10^{-9} M$, con cafeína en anillos con endotelio funcional fue $1,66 \times 10^{-5} \pm 1,57 \times 10^{-5} M$ y con cafeína en anillos con endotelio disfuncional fue $7,75 \times 10^{-5} \pm 14,64 \times 10^{-5} M$. Las diferencias entre los grupos fueron significativas ($p=0,017$) (figura 2) y se debieron a diferencias entre la nitroglicerina y la relajación obtenida con cafeína en el grupo de anillos con endotelio disfuncional ($p=0,013$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la EC_{50} entre los anillos relajados con nitroglicerina y los anillos con endotelio funcional relajados con cafeína ($p=0,340$), ni entre anillos con endotelio funcional y con endotelio disfuncional relajados con cafeína ($p=0,314$).

Discusión

La respuesta vascular al consumo de cafeína en humanos ha sido parcialmente estudiada *in vivo*,

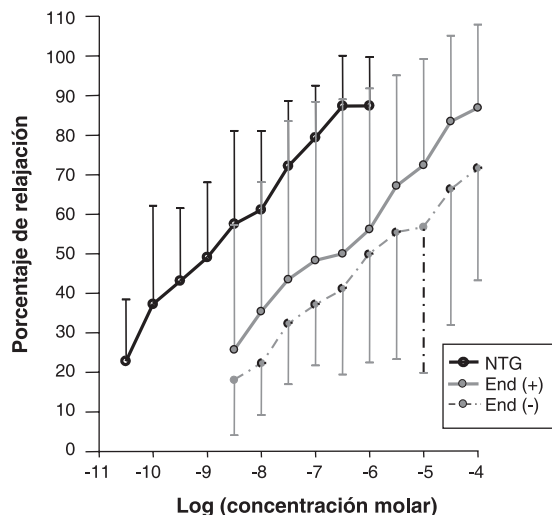


Figura 1. Comparación del comportamiento de relajación vascular obtenida con concentraciones acumulativas de nitroglicerina (NTG) ($10^{-11} M$ a $10^{-4} M$) y cafeína (de $3,16 \times 10^{-9} M$ a $1 \times 10^{-4} M$) en anillos de arteria mamaria interna procedentes de pacientes con enfermedad coronaria. Los puntos representan el promedio y las líneas la desviación estándar. End (+): efecto de la cafeína evaluado en arterias mamarias internas con endotelio funcional; End (-): efecto de la cafeína evaluado en arterias mamarias internas con disfunción endotelial. Para facilitar la lectura de la gráfica se presenta la desviación estándar de los datos en una sola dirección.

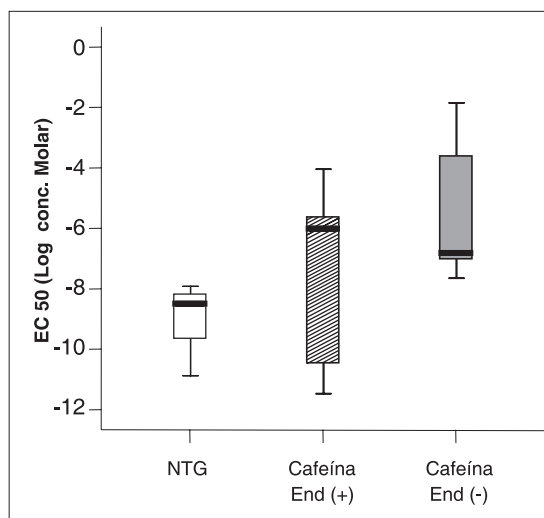


Figura 2. Diferencias en los valores de EC_{50} obtenidos con cafeína y con nitroglicerina (NTG) en anillos de arterias mamarias internas. Cafeína End (+): efecto de la cafeína evaluado en arterias mamarias internas con endotelio funcional. Cafeína End (-): efecto de la cafeína evaluado en arterias mamarias internas con disfunción endotelial.

usualmente en pacientes sanos, con protocolos que permiten evaluar parámetros vasculares indirectos (presión arterial, frecuencia cardiaca y flujo arterial) (22,23). Los resultados de nuestro estudio demuestran un potente efecto vasodilatador *in vitro* de la cafeína en anillos de arteria mamaria interna de pacientes con enfermedad coronaria seria y disfunción endotelial, a concentraciones equivalentes con las obtenidas *in vivo* con el consumo de café, lo cual no había sido reportado en humanos hasta el momento.

La población con enfermedad coronaria seria y con factores de riesgo para aterosclerosis (tabaquismo, hipertensión, dislipidemia, diabetes mellitus, etc.), tiene disfunción endotelial y usualmente consume café. Con base en los estudios previos, se ha considerado que el consumo de café es nocivo para la salud (3-8), motivo por el cual gran parte de la comunidad médica recomienda suspender el café en la dieta de pacientes con enfermedad aterosclerótica.

La cafeína ejerce efectos farmacológicos adicionales sobre los sistemas cardiovascular, respiratorio, renal y nervioso. Los efectos cardiovasculares

son inotrópicos, cronotrópicos y vasodilatadores (24). Algunos informes sugieren que la cafeína altera de manera adversa las propiedades mecánicas de las arterias y explican los cambios adversos sobre la presión arterial (25-27). Sin embargo, también se han descrito mecanismos en los que la cafeína induce efectos cardiovasculares benéficos, particularmente en tejidos con membranas intactas (28).

Los efectos vasodilatadores arteriales *in vitro* de la cafeína en modelos animales se han descrito previamente (15-18); en estos estudios se ha removido el endotelio y los efectos se han explicado por la acción directa sobre las células del músculo liso vascular. El mecanismo de acción vascular directo de la cafeína sobre las células de músculo liso vascular (efecto independiente del endotelio), se ha atribuido a la capacidad de la cafeína de inhibir la fosfodiesterasa cíclica (29,30), que hace que las concentraciones de los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) aumenten y ocasionan vasodilatación (31) a través de la reducción de las concentraciones intracelulares de Ca^{++} (32-34).

Mecanismos de acción de la cafeína

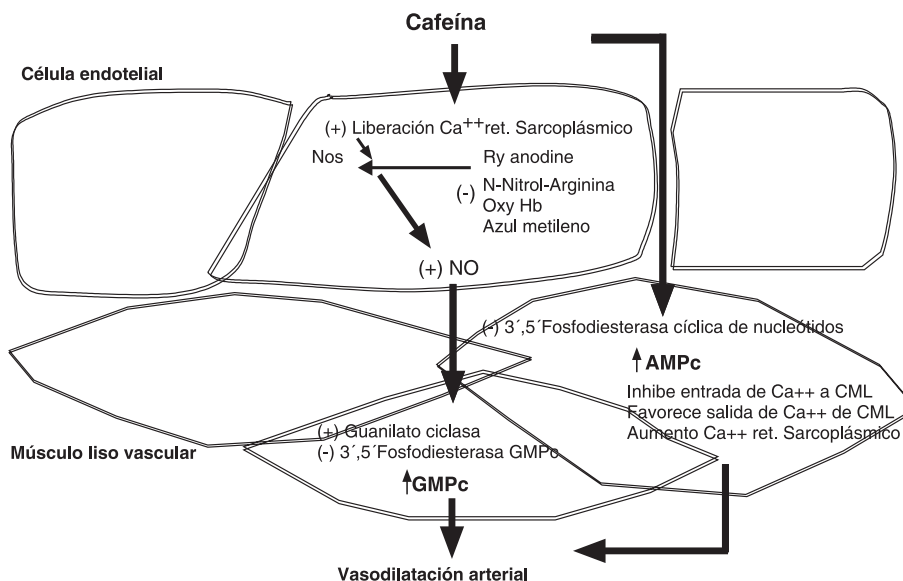


Figura 3. Mecanismos de la vasodilatación arterial inducida por cafeína

Asimismo, otros estudios han demostrado que la cafeína puede inducir vasodilatación arterial por mecanismos dependientes del endotelio, aumentando las concentraciones de Ca^{++} disponibles procedentes del retículo sarcoplásmico (15,28). El Ca^{++} liberado forma un complejo con la calmodulina, lo que activa la expresión y acción de la eNOS, para producir óxido nítrico (NO) mediante la degradación de L-arginina a citrulina (35). El óxido nítrico producido es no polar, por lo que cruza las membranas celulares sin necesidad de un transportador (36). Al entrar el óxido nítrico a la célula del músculo liso vascular, se une al grupo hemo de la ciclasa de guanilato (37) y activa la producción y concentración de GMPc, causando vasodilatación arterial (figura 3). Estos mecanismos de acción de la cafeína, dependientes e independientes de la integridad endotelial, podrían funcionar también en arterias mamarias internas de humanos y ayudar a explicar la ausencia de diferencias entre anillos con endotelio funcional y anillos con endotelio disfuncional en el porcentaje de relajación máximo y en las EC_{50} obtenidas con concentraciones acumulativas de cafeína en nuestro estudio. Sin embargo, se desconoce si los mecanismos de acción de la cafeína en humanos funcionan igual que en los modelos animales estudiados previamente y esta hipótesis aún debe ser evaluada.

Los resultados de este estudio demuestran por primera vez una importante relajación vascular inducida por la cafeína en anillos de arteria mamaria interna con endotelio funcional y con disfunción endotelial. Además, nuestros resultados sugieren que, bajo las condiciones en las cuales se realizó el ensayo, la cafeína puede tener un efecto tan potente como la nitroglicerina en arterias de pacientes con enfermedad coronaria seria de múltiples vasos.

Agradecimientos

Al Departamento de Cirugía Cardiovascular, por su colaboración en el suministro de tejido vascular.

Conflicto de intereses

Por parte de los autores no existe conflicto de interés.

Financiación

Este proyecto fue realizado con recursos económicos propios del Laboratorio de Investigación en Función Vascular.

Referencias

1. **Ascherio A, Chen H, Schwarzschild MA, Zhang SM, Colditz GA, Speizer FE.** Caffeine, postmenopausal estrogen, and risk of Parkinson's disease. *Neurology*. 2003;60:790-5.
2. **Bruce MS, Lader M.** Caffeine abstinence in the management of anxiety disorders. *Psychol Med*. 1989;19:211-4.
3. **Klag MJ, Wang NY, Meoni LA, Brancati FL, Cooper LA, Liang KY, et al.** Coffee intake and risk of hypertension: the Johns Hopkins Precursors Study. *Arch Intern Med*. 2002;162:657-62.
4. **James JE.** Critical review of dietary caffeine and blood pressure: A relationship that should be taken more seriously? *Psychosom Med*. 2004;66:63-71.
5. **Temple ME, Luzier AB, Kazierad DJ.** Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis. *Ann Pharmacother*. 2000;34:57-65.
6. **Brugada P, Gursoy S, Brugada J, Andries E.** Investigation of palpitations. *Lancet*. 1993;341:1254-8.
7. **Grobbee DE, Rimm EB, Giovannucci E, Colditz G, Stampfer M, Willett W.** Coffee, caffeine, and cardiovascular disease in men. *N Engl J Med*. 1990;323:1026-32.
8. **Tverdal A, Stensvold I, Solvoll K, Foss PO, Lund-Larsen P, Bjartveit K.** Coffee consumption and death from coronary heart disease in middle aged Norwegian men and women. *BMJ*. 1990;300:566-9.
9. **Wilson PW, Garrison RJ, Kannel WB, McGee DL, Caselli WP.** Is coffee consumption a contributor to cardiovascular disease? Insights from the Framingham Study. *Arch Intern Med*. 1989;149:1169-72.
10. **Woodward M, Tunstall-Pedoe H.** Coffee and tea consumption in the Scottish Heart Health Study follow up: conflicting relations with coronary risk factors, coronary disease, and all cause mortality. *J Epidemiol Community Health*. 1999;53:481-7.
11. **Corti R, Binggeli C, Sudano I, Spieker L, Hanseler E, Ruschitzka F, et al.** Coffee acutely increases sympathetic nerve activity and blood pressure independently of caffeine content role of habitual versus non-habitual drinking. *Circulation*. 2002;106:2935-40.
12. **Vanhouste PM, Perrault LP, Vilaine JP.** Endothelial dysfunction and vascular disease. In: Rubanyi GM and Dzau VJ Eds. *The endothelium in clinical practice. Source and target of novel therapies*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1997. p. 265-89.

13. **Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
14. **Habib JB, Bossaller C, Wells S, Williams C, Morriset JD, Henry PD.** Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol fed rabbit by treatment with the calcium blocker PN200110. *Cir Res.* 1986;58:305-9.
15. **Hatano Y, Mizumoto K, Yoshiyama T, Yamamoto M, Iranami H.** Endothelium-dependent and -independent vasodilation of isolated rat aorta induced by caffeine. *Am J Physiol.* 1995;269:H1679-84.
16. **Watanabe C, Yamamoto H, Hirano K, Kobayashi S, Kanaide H.** Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle. *J Physiol.* 1992;456:193-213.
17. **Sekiguchi F, Miyake Y, Kashimoto T, Sunano S.** Unaltered caffeine-induced relaxation in the aorta of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *J Smooth Muscle Res.* 2002;38:11-22.
18. **Ahn HY, Karaki H, Urakawa N.** Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988;93:267-74.
19. **Huraux C, Makita T, Montes F, Szlam F, Levy JH.** A comparative evaluation of the effects of multiple vasodilators on human internal mammary artery. *Anesthesiology.* 1998;88:1654-9.
20. **Tsuda A, Kenichi A, Huraux C, et al.** The in vitro reversal of histamine – induced vasodilatation in the human internal mammary artery. *Anesth Analg.* 2001;93:1453-9.
21. **He G, Buxton BF, Rosenfeldt FL, Wilson A, Angus JA.** Weak beta-adrenoreceptor mediated relaxation in the human internal mammary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;97:259-66.
22. **Umemura T, Ueda K, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, et al.** Effects of acute administration of caffeine on vascular function. *Am J Cardiol.* 2006;98:1538-41.
23. **Riksen NP, Franke B, van den Broek P, Smits P, Rongen GA.** The 1976C>T polymorphism in the adenosine A2A receptor gene does not affect the vasodilator response to adenosine in humans *in vivo*. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17:551-4.
24. **Daly JW.** Mechanisms of action of caffeine. En: Garattini S, editor. *Caffeine, coffee and health.* New York: Raven Press, Ltd.; 1993. p. 97-150.
25. **Pincomb GA, Lovallo WR, McKey BS, Sung BH, Passey RB, Everson SA, et al.** Acute blood pressure elevations with caffeine in men with borderline systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1996;77:270-4.
26. **Vlachopoulos Ch, Hirata K, O'Rourke MF.** Pressure-altering agents affect central aortic pressures more than is apparent from upper limb measurements in hypertensive patients: role of arterial wave reflections. *Hypertension.* 2001;38:1456-60.
27. **Vlachopoulos Ch, Hirata K, Stefanadis C, Toutouzas P, O'Rourke MF.** Caffeine increases aortic stiffness in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2003;16:63-6.
28. **Thuringer D, Sauve R.** A patch-clamp study of the Ca²⁺ mobilization from internal store in bovine aortic endothelium cells. I. Effects of caffeine on intracellular Ca²⁺ stores. *J Membr Biol.* 1992;130:125-37.
29. **Bryson SE, Rodger IW.** Effects of phosphodiesterase inhibitors on normal and chemically-skinned isolated airway smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1987;92:673-81.
30. **Shahid M, Rodger W.** Chronotropic and inotropic actions of amrinone, carbazeran and isobutylmethyl xanthine: role of phosphodiesterase inhibition. *Br J Pharmacol.* 1989; 98:291-301.
31. **Van der Bet V, Beny JL.** Mechanisms controlling caffeine-induced relaxation of coronary artery of the pig. *Br J Pharmacol.* 1991;103:1877-82.
32. **Martin C, Dacquet C, Mironneau C, Mironneau J.** Caffeine-induced inhibition of calcium channel current in cultured smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *Br J Pharmacol.* 1989;98:493-8.
33. **Nishikori K, Maeno H.** Close relationship between adenosine 3',5'-monophosphate-dependent endogenous phosphorylation of a specific protein and stimulation of calcium uptake in rat uterine microsomes. *J Biol Chem.* 1979;254:6099-106.
34. **Ahn HY, Karaki H, Urakawa N.** Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988;93:267-74.
35. **López-Jaramillo P, González MC, Palmer RMJ, Moncada S.** The crucial role of physiological Ca^{2a} concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol.* 1990;101:489-93.
36. **Cox MM.** Biosignaling. In: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL, editors. *Principles of Biochemistry.* New York: Worth Publishers; 2000. p. 411-61.
37. **Ignarro LJ, Burke TM, Wood M, Wolin S, Kadowitz PJ.** Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984;228:682-90.