

Efecto vasodilatador in vitro de la cafeína en aorta de conejos ateroscleróticos

Darío Echeverri, Lorena Buitrago, Alexandra Delgadillo, Marcela Beltrán y Félix Montes

Laboratorio de Investigación en Función Vascular. Fundación CardioInfantil. Instituto de Cardiología. Bogotá. Colombia.

Introducción. Se desconocen los efectos directos de la cafeína en arterias con disfunción endotelial y aterosclerosis.

Objetivo. Evaluar los efectos vasoactivos in vitro de la cafeína en anillos de aorta de conejos ateroscleróticos.

Metodología. La aterosclerosis fue inducida en conejos (n = 10) alimentados con dieta aterogénica (1% colesterol, durante 16 semanas) (grupo 1). El grupo control (n = 10) recibió una dieta estándar libre de colesterol (grupo 2). Al final de las 16 semanas, se sacrificó a los animales y se determinó el colesterol sérico. Los estudios de reactividad vascular y análisis morfométrico se llevaron a cabo en anillos de aorta torácica. Se estudió la reactividad vascular en respuesta a la acetilcolina, la nitroglicerina y la cafeína a 3 dosis correspondientes al contenido de esta sustancia de 1, 2 y 3 triples cafés expresso.

Resultados. La relajación máxima a la acetilcolina en arterias de conejos sanos ($22,5 \pm 16,8\%$) fue mayor que en arterias de conejos ateroscleróticos ($3,6 \pm 3,7\%$; $p = 0,006$). Aunque el efecto vasodilatador de la cafeína fue dependiente de la concentración ($p < 0,001$), no se encontraron diferencias entre las arterias provenientes de conejos sanos ($75,73 \pm 11,20\%$) y las de conejos ateroscleróticos ($68,19 \pm 15,07\%$; $p = 0,238$). La nitroglicerina produjo una relajación menor que la

cafeína, tanto en arterias de conejos sanos ($32,78 \pm 12,30\%$), como en las de conejos enfermos ($73,48 \pm 18,93\%$; $p < 0,001$). El EC_{50} (concentración del agente vasodilatador que causa un 50% de relajación) fue similar para los 2 vasodilatadores ($p = 0,178$). Las lesiones aórticas en el grupo 1 consistieron en placas tempranas. El recubrimiento endotelial (CD31) fue del $92,2 \pm 5,6\%$ y el $92 \pm 4,8\%$, respectivamente ($p = 0,927$).

Conclusiones. La cafeína ejerce un potente efecto vasodilatador arterial in vitro, independiente de la presencia o la ausencia de aterosclerosis.

Palabras clave:

Cafeína. Aterosclerosis. Vasodilatación.

IN-VITRO VASODILATOR EFFECT OF CAFFEINE IN ATHEROSCLEROTIC AORTA RABBITS

Introduction. The effects of caffeine on arteries with endothelial dysfunction and atherosclerosis are unknown.

Objective. To evaluate the in-vitro vasoactive effects of caffeine on aortic rings from atherosclerotic rabbits.

Methodology. Atherosclerosis was induced in rabbits (n = 10) fed an atherogenic diet (1% cholesterol) (group 1). The control group (n = 10) received a cholesterol-free diet (group 2). At 16 weeks we evaluated serum cholesterol, and all the animals were sacrificed. Thoracic aorta rings were obtained for vasoreactivity studies and morphometric analyses. Agonists were nitroglycerine, acetylcholine, and caffeine at 3 doses corresponding to one, 2 and 3 triple espressos.

Results. Arterial relaxation with acetylcholine in arteries from healthy rabbits ($22.5 \pm 16.8\%$) was

Correspondencia: Dr. D. Echeverri.
Laboratorio de Investigación en Función Vascular.
Fundación CardioInfantil. Instituto de Cardiología.
Calle 163 A, número 13B-60. 1.º piso. Bogotá DC. Colombia.
Correo electrónico: decheverri@cardioinfantil.org;
funcionvascular@cardioinfantil.org

Recibido el 7-6-2007 y aceptado el 8-7-2007.

greater than in arteries from atherosclerotic rabbits ($3.6 \pm 3.7\%$; $p = 0.006$). Although the vasodilator effect of caffeine was dependent on the concentration ($p < 0.001$), no differences were found between arteries from healthy rabbits ($75.73 \pm 11.20\%$) and those from diseased rabbits ($68.19 \pm 15.07\%$; $p = 0.238$). Nitroglycerine generated less relaxation than caffeine, both in arteries from healthy rabbits ($32.78 \pm 12.30\%$) and from diseased rabbits ($73.48 \pm 18.93\%$; $p < 0.001$). The EC_{50} (half maximal effective concentration) was similar for both vasodilators ($p = 0.178$). The aortic lesions in group 1 consisted of early plaques. The endothelial covering (CD31) was $92.2 \pm 5.6\%$ and $92 \pm 4.8\%$ respectively ($p = 0.927$).

Conclusions. Caffeine exerts a potent arterial vasodilator effect in-vitro regardless of the presence or absence of atherosclerosis.

Key words:

Caffeine. Atherosclerosis. Vasodilation.

Introducción

El café es la bebida estimulante más consumida en el mundo actualmente. La cafeína (CAF) (1, 3,7-trimetilxantina) es el principio activo más conocido del café y se ha estudiado en diferentes condiciones de salud física y mental^{1,2}. La relación entre el consumo de café y la 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 a la presión arterial^{3,4}, el perfil de lípidos⁴, los valores de homocisteína⁵, así como favorecer la presencia de taquicardia y arritmias cardíacas^{6,7} e inducir más incidencia de enfermedad coronaria sintomática⁸. En contraparte a esta información, otros estudios indican que el consumo de café podría tener efectos beneficiosos, o al menos no nocivos, en el sistema cardiovascular^{9,10}, y que los efectos adversos adjudicados a la CAF pueden deberse a otros ingredientes del café diferentes a la CAF¹¹.

En distintas enfermedades vasculares o condiciones patológicas, la relajación vascular dependiente del endotelio está anormalmente reducida¹² y la reactividad vascular arterial anormal se ha observado en presencia de una afectación de la función endotelial¹³. Se ha comprobado que la relajación vascular en respuesta a la acetilcolina (ACh) está disminuida en conejos hipercolesterolémicos¹⁴. Se ha demostrado que la aplicación de CAF tiene un efecto vasodilatador en arterias de ratas sanas¹⁵⁻¹⁷ e hipertensas¹⁷; adicionalmente, se ha en-

contrado que este efecto es independiente de la desnudación in vitro del endotelio¹⁵⁻¹⁷.

En todas sus etapas, la aterosclerosis se asocia a disfunción endotelial e inflamación, que en conjunto podrían afectar a la reactividad arterial¹⁸. Como se desconoce el efecto vascular directo de la CAF en presencia de factores de riesgo, disfunción endotelial y aterosclerosis, en el presente estudio realizamos un análisis de los efectos in vitro de la CAF en la relajación vascular de arterias de conejos con aterosclerosis, y comparamos su efecto vasodilatador con el de la nitroglicerina (NTG).

Metodología

Animales

El Comité de Ética en Investigación Animal (CEIA) de la Fundación CardioInfantil aprobó este proyecto. Se realizó un estudio experimental, aleatorizado y controlado. Se utilizó un modelo experimental de aterosclerosis, en conejos machos de raza Nueva Zelanda, tal como está descrito en estudios previos^{19,20}. Diez animales (grupo 1) recibieron una dieta controlada con suplemento de colesterol al 1% por períodos de 4 semanas, alternada con una dieta normal (Purina SA) para un total de 16 semanas. Se alimentó a otros 10 animales (grupo 2) con dieta normal durante todo el período experimental.

Medición del colesterol sérico

Después de un período de aclimatación de 1 semana, se midieron los valores séricos de colesterol de cada animal en estado basal. Para esto, bajo los efectos de anestesia con ketamina (50 mg/kg intramuscular [i.m.]), a todos los animales se extrajeron 5 µl de sangre periférica en estado de ayuno. Posteriormente, en la semana 16, se obtuvo una segunda muestra sanguínea de control.

Eutanasia y preparación del tejido vascular

La eutanasia se desarrolló al final de la semana 16 de seguimiento. Se utilizó anestesia general con ketamina (50 mg/kg i.m.) e inyección letal de tiopental sódico (Pentotal®, USP) 150 mg/kg por vía intravenosa. Inmediatamente después, la aorta fue cuidadosamente aislada y disecada. El segmento proximal de la aorta torácica se aisló y dividió en 8 anillos para el estudio de relajación vascular in vitro. El segmento de aorta torácica restante se mantuvo y perfundió manualmente con formaldehído en solución de fosfato al 10% a presión de 80 mmHg durante 10 min. De este segmento, la porción distal de la aorta torácica, por encima de la arteria renal derecha, se cortó de modo cuidadoso en un segmento de 2 cm para realizar los análisis histomorfométricos.

Reactividad arterial in vitro

La preparación del segmento de aorta torácica, para el estudio de relajación vascular in vitro, se realizó como se ha descrito previamente²¹. Cada segmento se transfirió al laboratorio para someterlo a disección y limpieza del tejido conectivo exuberante. Se colocaron 8 anillos obtenidos de cada segmento en baños de órgano con solución de Krebs-Henseleit con la composición siguiente (en mM): cloruro sódico 117; cloruro de potasio 4,7; cloruro de calcio 6,1; sulfato de magnesio 1,17; bicarbonato de sodio 24,9; D-glucosa 11, y pH $7,40 \pm 0,05$. El

tiempo entre la obtención del tejido aórtico y su preparación fue inferior a 30 min.

Preparación de anillos vasculares aislados

Los anillos se suspendieron entre 2 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 oxígeno al 95% y dióxido de carbono al 5%. Se conectaron las asas de alambre 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). Se definió una tensión en reposo de 2 g en observaciones preliminares y, después de obtenerlo, el tejido se sometió a un período de estabilización de 60 min.

Evaluación de la relajación vascular

Cada segmento de aorta obtenido de cada animal se dividió en 8 anillos, cada uno de los cuales se precontrajo con norepinefrina (NE) $3,16 \times 10^{-6}$ M, y se utilizó de la manera siguiente: en 3 anillos se evaluó la relajación independiente de endotelio (RIE) utilizando NTG en dosis acumulativas (10^{-8} a 10^{-4} M); en 2 anillos se evaluó la relajación dependiente de endotelio (RDE) con el uso de Ach $3,16 \times 10^{-6}$ M; y en 3 anillos se evaluó la relajación con cafeína (CAF) utilizando CAF en 3 dosis acumulativas de $2,4 \times 10^{-5}$ M, $4,6 \times 10^{-5}$ M y $6,9 \times 10^{-5}$ M; concentraciones que corresponden a 1, 2 y 3 veces el valor plasmático de CAF reportado en bebedores no habituales después de la ingesta de un "café triple expresso"¹¹. Sólo se administró un tratamiento en cada anillo (NTG, Ach o CAF) y se realizó el promedio de los resultados para cada uno de estos agentes vasoactivos y por cada animal.

A partir de los resultados obtenidos para cada vasodilatador, se calculó el EC_{50} , el cual se define como la concentración del agente vasodilatador que causa un 50% de relajación. El EC_{50} se determinó para cada curva contracción-relajación por la ecuación siguiente (ajuste logístico de una curva)²²:

$$E = MAP/(AP + KP),$$

donde E es la respuesta, M es la máxima contracción (o relajación), A es la contracción, K es la concentración EC_{50} y P es la pendiente del parámetro. A partir de esta ecuación, el valor medio $EC_{50} \pm$ desviación estándar se calculó en cada grupo y para cada fármaco.

Agentes vasoactivos

NE sal bitartrato, Ach cloridra y CAF anhidra se obtuvieron de Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). La NTG se obtuvo de American Regents Laboratories, Inc. (Shirley, NY, EE.UU.).

Análisis histomorfométrico

Procesamiento del tejido. Después de la fijación tisular en formalina, los segmentos se embebieron en parafina a 56-58 °C. Las secciones se realizaron a 4 μ m y se teñieron con el método de tricrómico de Masson y elástica e inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra macrófagos de conejo RAM-11, y anticuerpos monoclonales para células endoteliales CD31 (DAKO® Corporation, Carpintería, CA) para documentar la presencia de macrófagos/células espumosas y cobertura luminal por células endoteliales, respectivamente. Se realizó un análisis individual de los segmentos utilizando un microscopio de luz (Olympus BX50). Los segmentos se midieron usando morfometría digital y planimetría computarizada (Media Cybernetics® Image-Pro Plus™).

Morfometría. Cada segmento de aorta examinado se localizó sistemáticamente en el centro del campo del objetivo, con magnificación 2 \times . El área del vaso corresponde al área comprendida dentro de la lámina elástica externa (mm²), el área del lumen corresponde al área dentro de la superficie endotelial (mm²) y el área de la placa aterosclerótica corresponde al área comprendida entre la lámina elástica interna y el lumen arterial cuantificado en μ m². Los macrófagos/células espumosas se definieron por células positivas a anticuerpos RAM-11 en la íntima arterial, con magnificación 40 \times . Las células endoteliales se definieron como la presencia de células positivas a anticuerpos CD31 en la luz de la arteria y las cuantificamos en porcentaje de cobertura de la superficie luminal en forma ciega, con una magnificación 60 \times , tanto en los segmentos de aorta del grupo control, como del grupo enfermo, con el método que Fonseca et al²³ describieron previamente.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Para determinar si hubo diferencias en el peso y en el colesterol sérico entre el grupo 1 y el grupo 2, se realizaron pruebas de la t de Student. Para determinar si hubo diferencias en la relajación con Ach entre las arterias de los conejos del grupo 1 y del grupo 2, se realizó una prueba U de Mann Whitney.

Para realizar los análisis estadísticos, los valores de EC_{50} se normalizaron a partir de la transformación $-\log$ molar. Se realizó análisis de medidas repetidas para: a) determinar el efecto de las dosis de CAF y las diferencias entre los 2 grupos de conejos en la vasorreactividad obtenida con CAF, y b) evaluar si hubo diferencias debidas al fármaco (CAF y NTG) y a la dieta (normal y aterogénica) en la reactividad vascular (relajación máxima y EC_{50}). Con el fin de determinar si hubo diferencias morfométricas en los segmentos de los 2 grupos asociadas con el tipo de dieta, se realizaron pruebas de la t de Student. El valor de significación estadística se estableció con una significación estadística de $p \leq 0,05$. Para realizar los análisis estadísticos, utilizamos el software SPSS, versión 10.5.

Resultados

De los 20 animales que comenzaron el estudio, un animal falleció por neumonía. Diecinueve terminaron la observación durante las 16 semanas (grupo 1, n = 10; grupo 2, n = 9). El peso al final de la observación fue de $4,3 \pm 0,3$ kg en el grupo 1 y $4,0 \pm 0,5$ kg en el grupo 2 ($p = 0,01$).

Valores de colesterol sérico

La cifra de colesterol total basal al comienzo del estudio fue de $53,1 \pm 5,3$ mg/dl para el total de los animales. Al finalizar el estudio, la cifra de colesterol total en el grupo 1 fue de $221,8 \pm 29,1$ mg/dl, y en el grupo 2, de $54,9 \pm 7,3$ mg/dl ($p = 0,002$).

Relajación vascular

En el grupo 1, la Ach indujo una relajación vascular máxima de $3,6 \pm 3,7\%$, y en el grupo 2, de $22,5 \pm 16,8\%$ ($p = 0,006$). La relajación vascular obtenida con CAF fue dependiente de la concentración (fig. 1), sin que se observaran diferencias significativas entre los grupos en la relajación máxima alcanzada

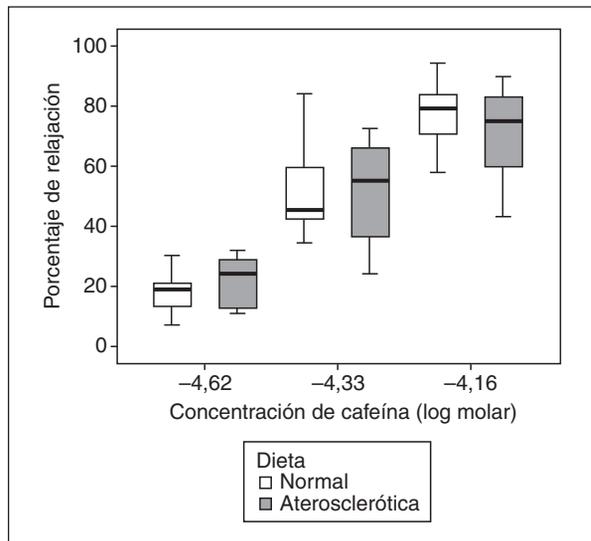


Figura 1. Porcentaje de relajación vascular inducido por cafeína en anillos de aorta precontraídos con norepinefrina (-5,5 log molar), procedentes de conejos ateroscleróticos después de la administración de una dieta rica en colesterol al 1% durante 16 semanas (cajas de color gris) y de conejos sanos (cajas de color blanco). Se ilustra la vasodilatación arterial inducida por cafeína con dosis correspondientes a 1 (-4,62 M), 2 (-4,33 M) y 3 triples expresos (-4,16 M).

Tabla 1. Porcentajes de relajación vascular máxima obtenidos con cafeína

Concentración de cafeína (10 ⁻⁵ M)	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)	Diferencias entre grupos (p)
2,4	21,6 ± 9*	17,9 ± 6,7*	0,357
4,6	49 ± 18,1*	48,3 ± 9,9*	0,845
6,9	68,2 ± 15,1*	75,7 ± 11,2*	0,125

*Diferencias entre concentraciones p < 0,001. Datos presentados como media ± desviación estándar.

(tabla 1). Al comparar los efectos de la NTG y la CAF, encontramos que la CAF indujo más relajación que la NTG (p < 0,001) (tabla 2; fig. 2), sin que se obtuvieran diferencias significativas entre los 2 grupos de conejos (p = 0,238). Los valores de EC₅₀ obtenidos con los 2 vasodilatadores no mostraron diferencias significativas entre los 2 fármacos (NTG frente a CAF), ni entre los 2 grupos (tabla 3).

Morfología

En el grupo 1, las lesiones ateroscleróticas consistían principalmente en placas arterioscleróticas no muy elevadas, ricas en macrófagos/células espumosas, con escasa matriz extracelular y ausencia de cápsula fibrosa. No se observó ninguna placa de fibroateroma en este modelo. El análisis de inmunohistoquímica mostró también presencia de célu-

Tabla 2. Porcentajes máximos de relajación vascular obtenidos con cafeína y nitroglicerina

Fármaco	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)
Nitroglicerina	42,1 ± 12,8	32,8 ± 12,3
Cafeína	73,5 ± 18,9	75,7 ± 11,2
p	< 0,001	< 0,001

Datos presentados como media ± desviación estándar.

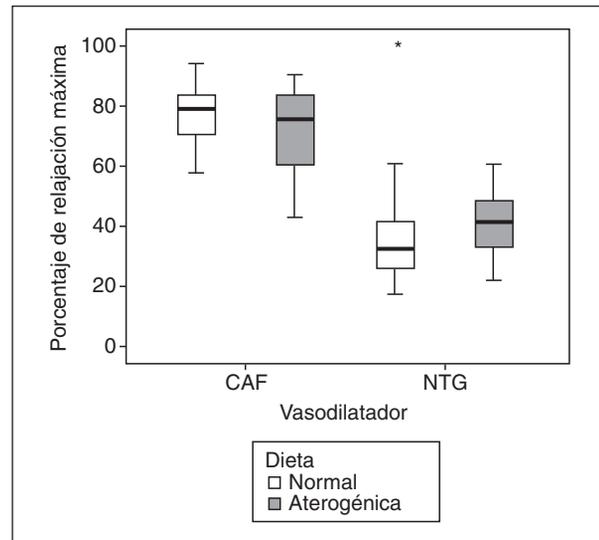


Figura 2. Porcentaje de relajación máxima inducida por cafeína (CAF) o nitroglicerina (NTG) en anillos de aorta precontraídos con norepinefrina (-5,5 log molar), procedentes de conejos con aterosclerosis (color gris) y de conejos sanos (color blanco). Se ilustra la mayor vasodilatación ocasionada por la CAF con respecto a la NTG (p < 0,001) y la ausencia de diferencias entre los 2 grupos de conejos en la respuesta a los vasodilatadores (p = 0,238).

Tabla 3. Valores de EC₅₀ obtenidos con la relajación vascular obtenida con cafeína y nitroglicerina

Fármaco	Grupo 1 EC ₅₀ (M) (10 ⁻⁵)	Grupo 2 EC ₅₀ (M) (10 ⁻⁵)	P
Nitroglicerina	10,9 ± 7,6	6,8 ± 4,81	0,761
Cafeína	4,7 ± 1,4	4,4 ± 3,3	0,874

Los valores de EC₅₀ (concentración del agente vasodilatador que causa un 50% de relajación) son presentados en M, y los análisis estadísticos se realizaron a partir de la transformación a log molar. Datos presentados como media ± desviación estándar.

las endoteliales teñidas con CD31 en el 92,22 ± 5,65% de la superficie luminal del grupo 1, y en el 92 ± 4,83% del grupo 2 (p = 0,927). Las características histomorfométricas de las lesiones en el grupo 1 fueron: área del vaso 6,8 ± 1,4 mm², área del lume 5,2 ± 1,4 mm² y área de placa

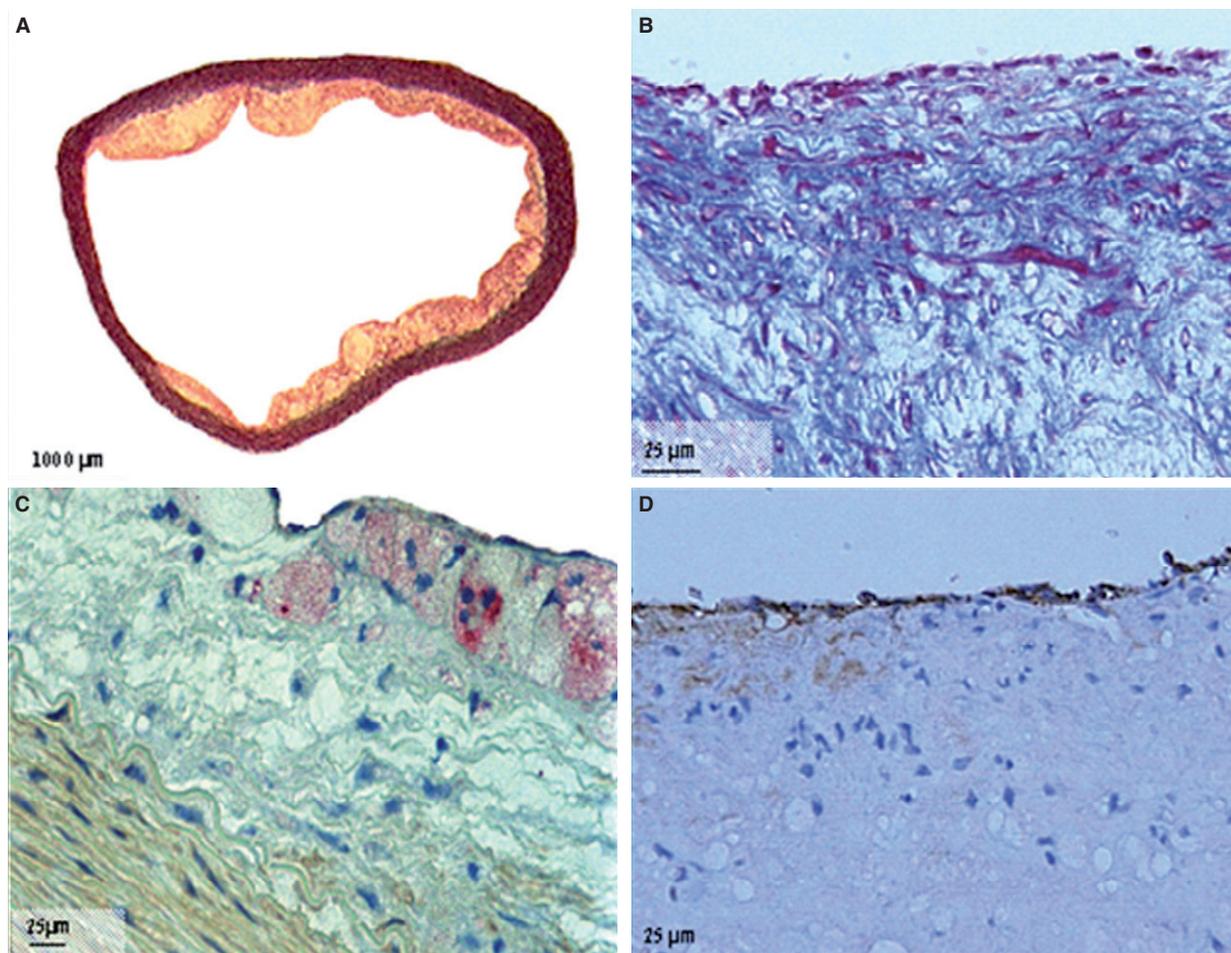


Figura 3. Cortes histológicos de aortas torácicas de conejos con aterosclerosis. A. Segmento de aorta, coloración tricrómico elástica; magnificación 2 \times . B. Segmento de aorta con tinción tricrómico elástica; magnificación 60 \times . C. Segmento de aorta con tinción de macrófagos/células espumosas; RAM-11 (anticuerpos monoclonales contra macrófagos de conejo); magnificación 40 \times . D. Sección de aorta con tinción de endotelio; CD31 (anticuerpos monoclonales para células endoteliales); magnificación 60 \times .

207 \pm 22,7 μm^2 . Las características histomorfométricas de las lesiones en el grupo 2 fueron: área del vaso, 6,3 \pm 1,6 mm^2 ($p = 0,572$), área del lumen 4,8 \pm 1,4 mm^2 ($p = 0,561$), y área de la placa 0,0 μm^2 ($p < 0,001$) (fig. 3).

Discusión

En este estudio se demostró que la CAF induce un efecto vasodilatador in vitro dependiente de la dosis, con dosis semejantes a las de consumo habitual en humanos, en segmentos de aorta torácica provenientes de conejos sanos, como también en conejos con dislipemia, disfunción endotelial y aterosclerosis. Adicionalmente, se encontró que la CAF indujo un porcentaje mayor de vasodilatación que la NTG, aunque no se observaron diferencias en el EC₅₀. Estos resultados implican que la CAF es un vasodilatador potente en arterias de aorta pro-

venientes de conejos y que podría desempeñar un papel vasculoprotector, lo que puede explicarse por los mecanismos de acción molecular de la CAF, los cuales son tanto independientes de la integridad del endotelio (al igual que la NTG), como dependientes del endotelio. Los efectos vasodilatadores arteriales in vitro de la CAF en modelos animales se han descrito previamente¹⁵⁻¹⁷; en estos estudios se ha denudado el endotelio y los efectos se han explicado por la acción directa en las células del músculo liso vascular. El mecanismo de acción vascular directo de la CAF en las células de músculo liso vascular (efecto independiente de endotelio), se ha atribuido a la capacidad de la CAF para inhibir la fosfodiesterasa cíclica^{24,25}, haciendo que las concentraciones de nucleótidos cíclicos (monofosfato de adenosina cíclico [AMPc] y monofosfato de guanosina cíclico [GMPc]) aumenten, ocasionando va-

sodilatación²⁶, a través de sus acciones en reducir las concentraciones de calcio sérico (Ca⁺⁺) intracelular²⁷⁻²⁹.

Asimismo, diversos estudios han demostrado que la CAF puede inducir vasodilatación arterial por mecanismos dependientes de endotelio, y aumentar las concentraciones de Ca⁺⁺ disponibles procedentes del retículo sarcoplásmico^{15,30}. El Ca⁺⁺ liberado forma un complejo con la calmodulina, lo que activa la acción del óxido nítrico (NO) sintasa endotelial, para producir NO mediante la degradación de L-arginina a citrulina³¹. El NO producido es no polar, por lo que cruza las membranas celulares sin necesidad de un transportador³². Al entrar el NO a la célula del músculo liso vascular, éste se une al grupo heme de la guanilato ciclasa³³, y activa la producción y la concentración de GMPc, causando vasodilatación arterial.

Los resultados de nuestro estudio demuestran el efecto vasodilatador de la CAF en arterias sanas (endotelio normal), y en arterias en las cuales la relajación arterial dependiente del endotelio secundaria a la aplicación de Ach estuvo significativamente disminuida, con los análisis histopatológicos que corroboran la presencia de lesiones ateroscleróticas tempranas ricas en macrófagos/células espumosas. En este caso, la disfunción endotelial se debe a una alteración en la señalización de membrana, debida a alteraciones de la función de las proteínas G³⁴, o a un incremento en la degradación oxidativa del NO, como ya se ha demostrado previamente³⁵.

Adicionalmente, nuestros resultados indican que con concentraciones similares al consumo de un triple café expresso, la CAF induce una vasodilatación leve a moderada, mayor que la inducida por la NTG. A concentraciones mayores correspondientes a 2 triples cafés expresso, induce una respuesta de vasodilatación un 127% mayor, y con 3 triples expresso, un 216% superior a la primera dosis, con lo que se obtiene una relación dosis-respuesta que triplica el efecto vasodilatador tanto en arterias sanas como enfermas. Los porcentajes más elevados de relajación obtenidos con CAF podrían deberse a que la CAF actúa en 2 vías metabólicas diferentes para generar la vasodilatación arterial¹⁵: a) una mediada directamente por las células del músculo liso vascular, y b) otra mediada por las células endoteliales que, aunque con algún grado de disfunción, podrían contribuir a la liberación de NO.

Como la enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte e incapacidad en el mundo occidental³⁶, el café, la bebida caliente más consumida en el mundo, y a partir de nuestros resultados,

es de interés prioritario realizar estudios clínicos que validen el efecto vasodilatador arterial de la CAF en pacientes con factores de riesgo, disfunción endotelial y aterosclerosis.

En conclusión, los resultados de este estudio demuestran una potente relajación vascular inducida por la CAF en segmentos aislados de aorta de conejos sanos e hipercolesterolémicos, con disfunción endotelial y aterosclerosis. Su efecto vasodilatador arterial puede obtenerse con dosis de consumo comunes desde 1 a 3 triples cafés expresso. Los diferentes mecanismos de acción para inducir relajación vascular, tanto en arterias sanas, como en arterias enfermas, podrían indicar un efecto "vasculoprotector" de la CAF.

Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento de manera amplia a las Dras. Ingrid Mejía y María del Pilar González por el cuidado diario de los animales. Asimismo, a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de La Salle, por su ayuda en el mantenimiento de los animales.

Bibliografía

- 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.
- Bruce MS, Lader M. Caffeine abstinence in the management of anxiety disorders. *Psychol Med*. 1989;19:211-4.
- 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.
- James JE. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: A relationship that should be taken more seriously? *Psychosom Med*. 2004;66:63-71.
- Temple ME, Luzier AB, Kazierad DJ. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis. *Ann Pharmacother*. 2000;34:57-65.
- Brugada P, Gurosoy S, Brugada J, Andries E. Investigation of palpitations. *Lancet*. 1993;341:1254-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Corti R, Binggeli Ch, Sudano I, Spieker L, Hänseler 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.
- Vanhoutte PM, Perrault LP, Vilaine JP. Endothelial dysfunction and vascular disease. En: Rubanyi GM, Dzau VJ, editors. *The endothelium in clinical practice. Source and target of novel therapies*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997. p. 265-89.
- 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. *Circ 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. Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherothrombosis from population biology and bench research to clinical practice. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:A33-46.
19. Abela GS, Picon PD, Friedl SE, Gebara OC, Miyamoto A, Felderman M, et al. Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *Circulation*. 1995;91:776-84.
20. Aikawa M, Sugiyama S, Hill CC, Voglic SJ, Rabkin E, Fukumoto Y, et al. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation*. 2002;106:1390-6.
21. 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.
22. 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.
23. Fonseca FAH, Izar MC, Fuster V, Gallo R, Padurean A, Fallon JT, et al. Chronic endothelial dysfunction after oversized coronary balloon angioplasty in pigs: a 12-week follow-up of coronary vasoreactivity in vivo and in vitro. *Atherosclerosis*. 2001;154:61-9.
24. Bryson SE, Rodger IW. Effects of phosphodiesterase inhibitors on normal and chemically-skinned isolated airway smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1987;92:673-81.
25. Shahid M, Rodger W. Chronotropic and inotropic actions of amrinone, carbazeren and isobutylmethyl xanthine: role of phosphodiesterase inhibition. *Br J Pharmacol*. 1989;98:291-301.
26. Van der Bet V, Beny JL. Mechanisms controlling caffeine-induced relaxation of coronary artery of the pig. *Br J Pharmacol*. 1991;103:1877-82.
27. 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.
28. 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 Bio Chem*. 1979;254:6099-106.
29. 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.
30. 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 Bio*. 1992;130:125-37.
31. López-Jaramillo P, González MC, Palmer RMJ, Moncada S. The crucial role of physiological Ca²⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol*. 1990;101:489-93.
32. Cox MM. Biosignaling. En: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, editors. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers; 2000. p. 411-61.
33. 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.
34. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation*. 1991;83:652-60.
35. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*. 1993;91:2546-51.
36. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, et al; for the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2007 Update A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007;115:1-102.