

## Efectos de la Exposición al Humo Lateral del Cigarrillo sobre el Barorreflejo en Ratones Adultos

Vitor E. Valenti<sup>1,2</sup>, Luiz Carlos de Abreu<sup>2</sup>, Celso Ferreira<sup>1,3</sup>

Departamento de Medicina, Disciplina de Cardiologia, UNIFESP<sup>1</sup>, São Paulo, SP; Departamento de Morfologia e Fisiologia, Faculdade de Medicina do ABC<sup>2</sup>; Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Cardiologia, Faculdade de Medicina do ABC<sup>3</sup>, Santo André, SP - Brasil

### Resumen

**Fundamento:** Ha sido demostrado en la literatura que la exposición al humo del cigarrillo causa hipertensión en ratones; entre tanto, aun no fue demostrado si la función barorreflexa está perjudicada antes que el animal se vuelva hipertenso.

**Objetivo:** Evaluamos los efectos de corto plazo de la exposición al humo lateral del cigarrillo (HLC) sobre la función barorreflexa en ratones Wistar normotensos.

**Métodos:** Los ratones fueron expuestos al HLC durante tres semanas, 180 minutos, cinco días por semana, a una concentración de monóxido de carbono entre 100-300 ppm. La presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC) fueron evaluadas a través de canulación de la vena y arteria femoral.

**Resultados:** No hubo diferencia significativa entre los grupos control y HLC en relación a la MAP y FC, componentes simpáticos y parasimpáticos de la función barorreflexa.

**Conclusión:** Nuestros datos sugieren que tres semanas de exposición a la HLC no son suficientes para causar daño significativo a los parámetros cardiovasculares y sensibilidad barorreflexa en ratones Wistar normotensos. (Arq Bras Cardiol 2011; 96(2) : 148-153)

**Palabras-clave:** Tabaco, humo, lesión por inhalación de humo, barorreflejo, ratones.

### Introducción

El tabaco tiene un importante papel en términos de distribución de metales-trazo tóxicos para la salud humana y ambiental<sup>1</sup>. El humo del cigarrillo puede ser clasificado en dos categorías, siendo una la vía principal del humo de cigarrillo (*mainstream*), generalmente inhalado por fumadores activos y la segunda siendo la vía secundaria del humo de cigarrillo (*sidestream*), o humo lateral del cigarrillo (HLC), emitida por el cigarrillo e inhalada por los así llamados "fumantes pasivos". Es sabido que la exposición al humo lateral del cigarrillo contiene una variedad de oxidantes y otros compuestos nocivos mucho mayor que aquellos contenidos en el humo de la vía principal. Los fumadores pasivos son de esa forma, expuestos casi a las mismas sustancias químicas en el humo del cigarrillo que los fumadores activos. Siendo así, el tabaco pasivo aumenta el riesgo de enfermedades cardíacas y otras enfermedades relacionadas en no fumadores<sup>2,3</sup>.

En la fisiología cardiovascular, el barorreflejo o reflejo barorreceptor es uno de los mecanismos homeostáticos del cuerpo para mantener la presión arterial<sup>4</sup>. Aunque haya sido demostrado en la literatura que la exposición al humo del

cigarrillo aumenta la presión arterial en ratones<sup>5</sup>, aun no fue demostrado si la función barorreflexa estaba comprometida antes de que el animal se vuelva hipertenso.

Siendo así, ese estudio investigó el reflejo barorreceptor en ratones expuestos al HLC en corto plazo.

### Método

#### Animales

Ratones Wistar (300-400g) fueron mantenidos en el bioterio de nuestra Universidad. Los ratones fueron mantenidos en jaulas plásticas individuales bajo condiciones de laboratorio estándar. Fueron mantenidos en un ciclo claro-oscuro de 12 horas (lucos encendidas a las 07:00 h) y tenían acceso libre a comida y agua. Los animales fueron divididos en dos grupos: Control (n=18), ratones expuestos al aire ambiente y HLC (n=15), ratones expuestos al humo lateral del cigarrillo (HLC). El Comité de Ética Animal de la Institución autorizó las condiciones de alojamiento de los animales y procedimientos experimentales. Todos los esfuerzos fueron hechos para minimizar el número de animales utilizados en el experimento.

#### Exposición a humo lateral del cigarrillo

los ratones fueron colocados en una cámara transparente, con un volumen de aproximadamente 95x80x65 cm<sup>3</sup>, donde fueron colocados cuatro ratones. La concentración de monóxido de carbono (CO) del humo de cigarrillo fue

Correspondencia: Vitor E. Valenti •

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Rua Napoleão de Barros, 715 - Térreo - 04039-032 - São Paulo, SP - Brasil  
E-mail: valenti@unifesp.br, vitfisi@hotlmail.com  
Artículo recibido en 28/11/09; revisado recibido en 08/04/10; aceptado en 28/05/10.

mantenida entre 100-300 ppm<sup>6</sup>. Los ratones fueron colocados en la cámara transparente y los cigarrillos fueron colocados dentro de la cámara en una pequeña caja para evitar que los ratones tocasen el cigarrillo. El HLC era producido a través de la quema de los cigarrillos dentro de la cámara sin filtro, que es la principal característica del HLC.

Cuando la concentración de CO alcanzaba 100 ppm el conteo era iniciado (hasta 180 minutos). Los cigarrillos eran substituidos por nuevos cigarrillos a fin de mantener la concentración de CO entre 100-300 ppm<sup>7</sup>. Los ratones eran expuestos al HLC por 180 minutos, cinco días por semana; la duración total de esos experimentos fue de tres semanas y todas las exposiciones fueron hechas por la mañana, entre 8:00 y 12:00 horas. El cigarrillo utilizado era una marca comercial con la siguiente composición: 1.1 mg de nicotina, 14 mg de alquitrán y 15 mg de monóxido de carbono. Los animales control fueron mantenidos en el mismo lugar y bajo las mismas condiciones que el grupo HLC, pero fueron expuestos al aire ambiente.

### Procedimientos quirúrgicos

En el tercer día después de la última exposición al HLC, los ratones fueron anestesiados con cetamina (50 mg/kg i.p.) y xilazina (50 mg/kg i.m.) y un catéter fue insertado en la aorta abdominal a través de la arteria femoral para registro de la presión arterial y frecuencia cardíaca. Los catéteres eran hechos de segmentos de 4 cm de largo de PE-10 polietileno (Clay Adams, USA) unidos en caliente a un segmento de 13 cm de PE-50. Los catéteres fueron avanzados bajo la piel y exteriorizados en el dorso del animal<sup>4,8</sup>.

### Registro de la presión arterial y frecuencia cardíaca en los ratones acordados

después de la cirugía, los animales fueron mantenidos en jaulas individuales usadas en el transporte hasta la sala del experimento. Los animales tuvieron 20 minutos para adaptarse a las condiciones de la sala del experimento, tales como sonido e iluminación, antes del inicio del registro de la presión arterial y frecuencia cardíaca. La sala del experimento era acústicamente aislada y había ruido de fondo constante producido por un extractor de aire. Por lo menos otro período de 15 minutos fue permitido antes del inicio de los experimentos. La presión arterial pulsátil (PAP) de ratones moviéndose libremente fue registrada utilizando un preamplificador HP-7754A (Hewlett-Packard, EUA) y una placa de adquisición (MP100A, Biopac Systems Inc, EUA) conectada a un computador. Los valores de la presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca (FC) fueron derivados de los registros de PAP y procesados online<sup>4,9,10</sup>.

### Test del Barorreflejo

EL barorreflejo fue testado con una dosis presora de 0,1 mL de fenilefrina (FEN-en bolo-8 µg/kg IV; Sigma Chemical) y dosis depresoras de 0,1 ml de nitroprusiato de sodio (NPS- en bolo-50 µg/kg IV; RBI). El aumento del barorreflejo fue calculado como la derivación de la FC en función de la variación de la PAM ( $\Delta FC/\Delta PAM$ ). También analizamos el pico de bradicardia y taquicardia y la variación de la FC (la diferencia entre el pico de bradicardia y el de taquicardia)<sup>4</sup>.

### Análisis Estadístico

Los valores fueron expresados en medias  $\pm$  error estándar de las medias. La FC, PAM,  $\Delta FC$ ,  $\Delta PAM$  y  $\Delta FC/\Delta PAM$  fueron comparadas entre los ratones expuestos a la HLC y el aire ambiente. Después de que las distribuciones fueron evaluadas a través del test de normalidad de Kolmogorov, el test t de Student no pareado fue utilizado para identificar las diferencias entre las distribuciones normales (PAM, FC, hipertensión inducida por la FEN, reflejo bradicárdico, disminución en la PAM inducida por NPS, reflejo taquicárdico, pico de bradicardia, pico de taquicardia, variación en la FC y aumento de barorreflejo testado con NPS) y el test de Mann-Whitney fue utilizado para evaluar diferencias entre las distribuciones no paramétricas (aumento barorreflejo testado con FEN). A fin de comparar peso corporal antes y después de la exposición a la HLC, el test t de Student pareado fue aplicado. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando la probabilidad de error Tipo I fue menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

### Resultados

Comparamos el peso corporal antes y después de la exposición al HLC y observamos que en el grupo HLC el peso disminuyó significativamente ( $352,5 \pm 14,7$  g vs  $338,5 \pm 13,6$  g;  $p=0,0003$ ), mientras que no hubo diferencia en el grupo control (antes -  $365,7 \pm 17,5$  g vs después :  $366,8 \pm 18,3$  g;  $p=0,7374$ ).

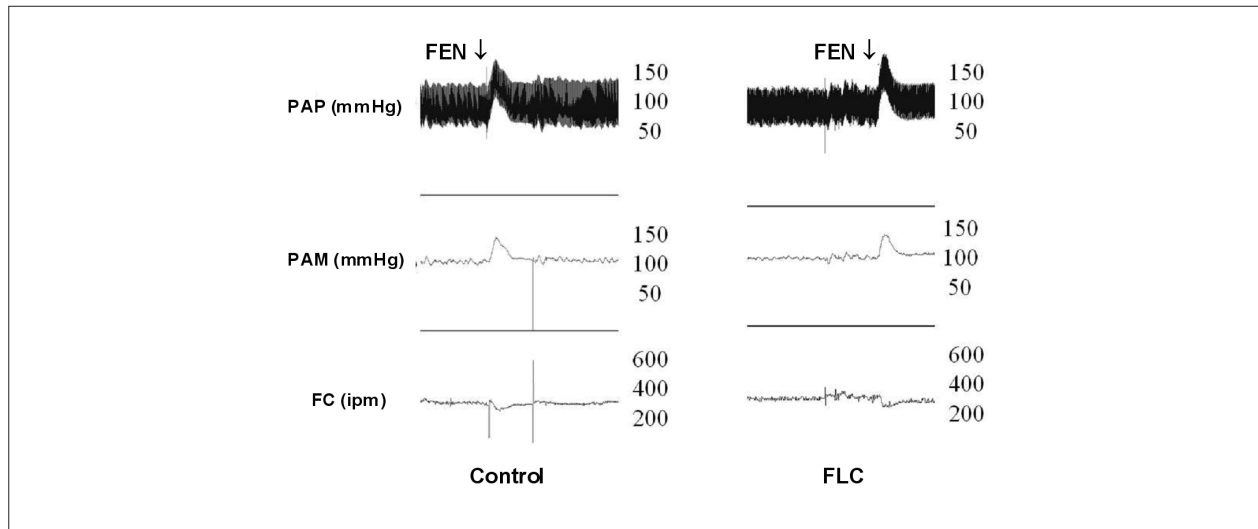
Como es mostrado en la Tabla 1, no observamos diferencias significativas entre los grupos HLC y control en relación a la PAM y FC basal, pico de bradicardia y taquicardia, variación en la FC y aumento del barorreflejo. Además de eso, la respuesta del reflejo bradicárdico a cambios en el aumento de la PAM no fue atenuada en ratones expuestos al HLC (C :  $-82,7 \pm 5,2$  vs HLC :  $-88 \pm 6,9$ ;  $p=0,392$ ) y el aumento en la PAM inducido por la FEN no fue significativamente diferente entre los grupos (C -  $48,6 \pm 2,3$  vs HLC -  $46,3 \pm 1,8$ ;  $p=0,395$ ). La Figura 1 presenta registros representativos obtenidos durante el test del barorreflejo con FEN en ratones acordados, no mostrando diferencias significativas entre los grupos control y HLC. La bradicardia refleja en respuesta al aumento en la presión arterial inducida por FEN fue similar en los dos grupos.

Las inyecciones intravenosas de NPS produjeron una respuesta vasodepresora, que no estaba estadísticamente

**Tabla 1 - Niveles basales de presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca (FC), pico de bradicardia y taquicardia, variación de la FC y aumento del barorreflejo (GB) en ratones expuestos al HLC (n=15) y aire ambiente (n=18)**

Variable	Control	HLC	Valor de p
PAM (mmHg)	$108,3 \pm 2,43$	$108,07 \pm 2,49$	0,8282
FC (lpm)	$326,56 \pm 9,38$	$319,87 \pm 7,89$	0,5981
Pico de Bradicardia (lpm)	$229,39 \pm 12,44$	$226 \pm 8,74$	0,8317
Pico de Taquicardia (lpm)	$464,72 \pm 10,87$	$490,13 \pm 6,89$	0,0689
Variación de la FC (lpm)	$240,5 \pm 12,89$	$259 \pm 6,4$	0,2484
GB (lpm x mmHg <sup>-1</sup> ) FEN	$-1,71 \pm 0,09$	$-1,92 \pm 0,16$	0,2617
GB (lpm x mmHg <sup>-1</sup> ) NPS	$-3,23 \pm 0,28$	$-2,86 \pm 0,15$	0,2785

## Artículo Original



**Figura 1** - Registros de un ratón del grupo control (n=18) y otro ratón del grupo expuesto al HLC (n=15) ilustrando la bradicardia refleja (arriba) en respuesta a aumentos en la presión arterial. Infusiones fueron dadas en bolo. PAM - presión arterial media; PAP - presión arterial pulsátil; FC - frecuencia cardíaca; FEN: fenilefrina.

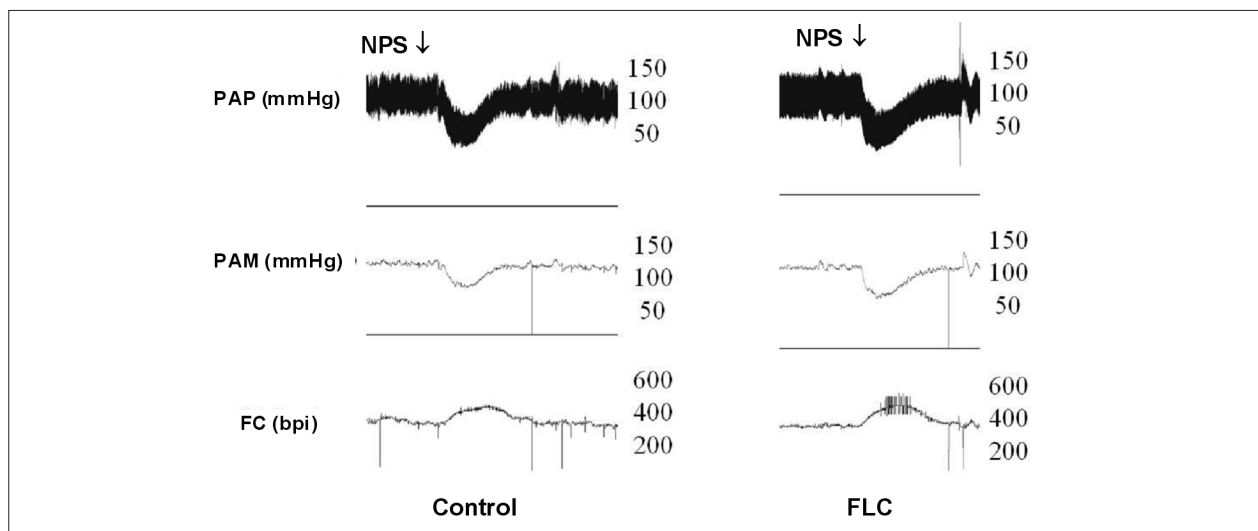
reducida en ratones expuestos al HLC, cuando fueron comparados con los ratones control (C :  $34,7 \pm 2,1$  vs HLC  $-39,4 \pm 1,7$ ;  $p=0,189$ ). Además de eso, la taquicardia refleja en respuesta a la disminución en la PAM inducida por NPS no estaba significativamente disminuida en el grupo HLC (C :  $104,4 \pm 7,4$  vs HLC  $-110 \pm 4,9$ ;  $p=0,557$ ). La Figura 2 muestra el registro representativo obtenido durante el test del barorreflejo con NPS en ratones acordados y ninguna diferencia significativa fue observada entre los grupos control y HLC. LA taquicardia refleja en respuesta a la disminución en la presión arterial inducida por NPS fue similar en ambos los grupos.

### Discusión

considerando los efectos tóxicos de los componentes de los cigarrillos previamente presentados en la literatura<sup>11-14</sup> y de otros agentes contaminantes<sup>15</sup> en el sistema cardiovascular,

objetivamos la evaluación de la función barorreflexa en ratones expuestos al HLC en corto plazo. Relatamos que apenas tres semanas de exposición, cinco días por semana y a una concentración de 100-300 ppm de CO no fueron suficientes para causar daño significativo a cualquier componente barorreflejo en ratones Wistar despiertos. Verificamos apenas una diferencia en relación al peso corporal antes y después de la exposición al HLC.

Nuestros datos demostraron que en ese grupo expuesto al HLC, el peso corporal estaba disminuido después del período de exposición. La falta de cualquier alteración en el grupo control es consistente con esa conclusión. De forma inversa, Paiva et al<sup>16</sup> no observaron ningún efecto significativa de la exposición del cigarrillo en el peso corporal. Creemos que esa diferencia entre los dos estudios sea explicada por los factores metodológicos. En nuestra investigación, expusimos animales al HLC por 180 minutos al día en el período de la mañana;



**Figura 2** - Registros de un ratón del grupo control (n=18) y otro ratón del grupo HLC (n=15), ilustrando taquicardia refleja (arriba) en respuesta a la disminuciones en la presión arterial. Las infusiones fueron dadas en bolo. PAM - presión arterial media; PAP - presión arterial pulsátil; FC - frecuencia cardíaca; NPS - nitroprusiato de sodio.

ese humo no era filtrado y presentaba densidad más alta de componentes letales, cuando era comparado a la vía principal del humo de cigarrillo (*mainstream*)<sup>17</sup>, mientras que Paiva et al<sup>16</sup> expusieron animales al humo de cigarrillos con filtro por 30 minutos por día, dos veces, en el período de la tarde.

No relatamos ninguna diferencia en el pico de taquicardia o bradicardia y variación de la FC entre los ratones expuestos al HLC y el grupo control de la misma edad. El pico de taquicardia es asociado con la respuesta simpática máxima a la reducción en la presión arterial; el pico de bradicardia es un índice de la respuesta parasimpática más alta al aumento en la presión arterial; el índice de variación en la FC representa la diferencia entre el pico superior y el inferior de la FC y la derivación de la FC en función de la variación de la PAM indica el aumento del barorreflexo<sup>18</sup>. Overton et al<sup>19</sup> sugirieron que la restricción crónica de comida reduce el desarrollo de hipertensión y apoyo simpático de la PAM en ratones espontáneamente hipertensos. Considerando que en nuestro estudio los ratones expuestos al HLC tuvieron su peso corporal reducido, es posible que ese hecho haya contribuido a la ausencia de hiperactividad simpática. Entre tanto, no medimos la ingestión de alimento en esos animales.

No hubo cambio significativo en la PAM y FC basal en los ratones expuestos al HLC. Un estudio reciente sugirió que la exposición aguda por inhalación de particulados concentrados del aire eleva la presión arterial en perros crónicamente instrumentados<sup>20</sup>. Varias razones pueden explicar la diferencia entre ese investigación y nuestros hallazgos. Primero, expusieron los perros a partículas finas (diámetros entre 0,15 y 2,5  $\mu\text{m}$ ) y nosotros expusimos ratones a HLC, que contiene miles de componentes químicos tóxicos conocidos y partículas con diámetro > 2.5  $\mu\text{m}$ . Segundo, la presión arterial fue evaluada a través de telemetría y nosotros canulamos la arteria femoral a fin de obtener medidas de presión arterial más precisas. Tercero, ellos expusieron modelos caninos por más de 50 días y en nuestro estudio, ratones fueron expuestos por 3 semanas. Cuarto, en nuestra investigación, los ratones fueron expuestos por 180 minutos por día y Bartoli et al<sup>20</sup> expusieron animales a particulados concentrados del aire por 5 horas por día. Aun considerando todas esas diferencias en relación a los aspectos metodológicos, creemos que esas tres semanas de exposición al HLC no fueron suficientes para causar los mismos efectos observados en el estudio de Bartoli et al<sup>20</sup>.

Aunque nuestros resultados no hayan indicado un efecto del HLC en la función barorreflexa, estudios anteriores investigaron los efectos de los componentes del cigarrillo en la función autonómica. Xiao et al<sup>21</sup> demostraron que la administración de nicotina intrauterina afecta la respuesta bradicárdica a la angiotensina. Shinozaki et al<sup>22</sup> demostró que el humo de cigarrillo en los fumadores estimula la actividad del nervio simpático a través de un efecto periférico directo y un efecto mediado centralmente. Además de la nicotina, el humo del cigarrillo contiene miles de otras sustancias químicas, incluyendo monóxido de carbono, cianuro de hidrógeno, óxidos de nitrógeno, aldehídos, N-nitrosaminas y hidrocarburos poliaromáticos. El HLC tiene una más alta concentración de sustancias tóxicas cuando es comparado al humo inhalado por el fumante activo, debido a la más baja temperatura de combustión, así como la falta de filtro<sup>17</sup>. Por

ejemplo, hay cinco veces más acroleína en el HLC, cuando es comparado con el humo inhalado por el fumante activo<sup>23</sup>. La acroleína es un aldehído insaturado que fue recientemente implicado en lesión endotelial relacionada al tabaco<sup>24</sup> y podría tener un papel en la atenuación del relajamiento inducido por la acetilcolina observada con HLC. Como un todo, esos datos contradicen nuestro estudio. Creemos que el período de exposición del estudio (tres semanas) no fue suficiente para afectar el barorreflejo en ratones Wistar.

En esa investigación, la función barorreflexa fue evaluada en ratones despiertos, ya que la actividad barorreflexa es disminuida bajo anestesia<sup>25,26</sup>, reduciendo la variación de la FC, que es el desenlace en un análisis de una porción restringida de la respuesta barorreflexa. De esa forma, creemos que nuestra investigación provea informaciones confiables sobre los efectos de un componente del humo de cigarrillo en la función barorreflexa en ratones Wistar. Sería también interesante evaluar otros reflejos cardiovasculares (por ex., reflejo cardiopulmonar y quimiorreflejo).

Esos datos presentan informaciones relevantes, considerando que actualmente el reflejo baroreceptor es ampliamente estudiado en diferentes modelos y cepas de ratones, con el objetivo de evitar el desarrollo de hipertensión en humanos<sup>4,27</sup>, debido al hecho de que la reducción de la función barorreflexa es indicativa de enfermedad cardiovascular<sup>27</sup>.

Reconocemos las limitaciones de nuestro estudio en que fuimos incapaces de proveer una curva completa de la función del reflejo baroreceptor. Entre tanto, los componentes del barorreflejo obtenidos aquí son de relevancia fisiológica, por que están próximos del punto de operación de ese reflejo en ratones acordados no limitados físicamente<sup>28</sup>.

Concluyendo, la exposición al humo lateral del cigarrillo por tres semanas consecutivas no afecta los componentes de la función barorreflexa en ratones Wistar despiertos.

## Contribución de los autores

Todos los autores participaron del delineamiento del estudio y elaboración del manuscrito, así como de la aprobación del manuscrito final.

## Agradecimientos

Agradecemos a Jason Saltzgeber por la corrección de la gramática de la lengua inglesa. Ese estudio recibió apoyo financiero de la Fundación de Amparo a la Investigación del Estado de São Paulo (FAPESP).

## Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

## Fuentes de Financiamiento

EL presente estudio fue financiado por la FAPESP.

## Vinculación Académica

Este artículo es parte de tesis de Doctorado de Vitor E. Valenti por la UNIFESP.

## Referencias

1. Milnerowicz H, Słowińska M. Concentration of metals, ceruloplasmin, metallothionein and the activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and gamma-glutamyltransferase in pregnant women who smoke and in those environmentally exposed to tobacco smoke and in their infants. Part I. *Int J Occup Med Environ Health*. 1997; 10 (2): 187-202.
2. Duarte DR, Oliveira LC, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Effects of the administration of beta-blockers on ventricular remodeling induced by cigarette smoking in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2009; 92 (6): 443-7, 462-6, 479-83.
3. Schick S, Glantz S. Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tob Control*. 2005; 14 (6): 396-404.
4. Valenti VE, Ferreira C, Meneghini A, Ferreira M, Murad N, Ferreira Filho C, et al. Evaluation of baroreflex function in young spontaneously hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol*. 2009; 92 (3): 205-9.
5. Castardeli E, Paiva SA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo OS, et al. Chronic cigarette smoke exposure results in cardiac remodeling and impaired ventricular function in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 84 (4): 320-4.
6. Gairola CG, Drawdy ML, Block AE, Daugherty A. Sidestream cigarette smoke accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Atherosclerosis*. 2001; 156 (1): 49-55.
7. Valenti VE, Abreu LC, Saldiva PH, Carvalho TD, Ferreira C. Effects of sidestream cigarette smoke exposure on baroreflex components in spontaneously hypertensive rats. *Int J Environ Health Res*. 2010 [In Press].
8. Valenti VE, de Abreu LC, Imaizumi C, Petenusso M, Ferreira C. Strain differences in baroreceptor reflex in adult Wistar Kyoto rats. *Clinics*. 2010; 65 (2): 203-8.
9. Cisternas JR, Valenti VE, Alves TB, Ferreira C, Petenusso M, Breda JR, et al. Cardiac baroreflex is already blunted in eight weeks old spontaneously hypertensive rats. *Int Arch Med*. 2010 Jan 27; 3: 2.
10. Valenti VE, Imaizumi C, de Abreu LC, Colombari E, Sato MA, Ferreira C. Intra-strain variations of baroreflex sensitivity in young Wistar-Kyoto rats. *Clin Invest Med*. 2009; 32 (6): E251.
11. Zornoff LA, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Effects of beta-carotene and smoking on heart remodeling after myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 89 (3): 135-41, 151-7.
12. Wells AJ. Passive smoking as a cause of heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 24 (2): 546-54.
13. Kawachi I, Colditz GA, Speizer FE, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC, et al. A prospective study of passive smoking and coronary heart disease. *Circulation*. 1997; 95 (10): 2374-9.
14. Cieślak M. New approach to environmental tobacco smoke exposure and its relation to reemission processes. *Int J Occup Med Environ Health*. 2006; 19 (2): 92-8.
15. Szyszkwicz M. Air pollution and emergency department visits for ischemic heart disease in Montreal, Canada. *Int J Occup Med Environ Health*. 2007; 20 (2): 167-73.
16. Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 81 (3): 221-8.
17. Rickert WS, Wright WG, Trivedi AH, Momin RA, Lauterbach JH. A comparative study of the mutagenicity of various types of tobacco products. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007; 48 (3): 320-30.
18. Head GA, McCarty R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J Auton Nerv Syst*. 1987; 21 (2-3): 203-13.
19. Overton JM, VanNess JM, Casto RM. Food restriction reduces sympathetic support of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 1997; 127 (4): 655-60.
20. Bartoli CR, Wellenius GA, Diaz EA, Lawrence J, Coull BA, Akiyama I, et al. Mechanisms of inhaled fine particulate air pollution-induced arterial blood pressure changes. *Environ Health Perspect*. 2009; 117 (3): 361-6.
21. Xiao D, Xu Z, Huang X, Longo LD, Yang S, Zhang L. Prenatal gender-related nicotine exposure increases blood pressure response to angiotensin II in adult offspring. *Hypertension*. 2008; 51 (4): 1239-47.
22. Shinozaki N, Yuasa T, Takata S. Cigarette smoking augments sympathetic nerve activity in patients with coronary heart disease. *Int Heart J*. 2008; 49 (3): 261-72.
23. Talbot P. In vitro assessment of reproductive toxicity of tobacco smoke and its constituents. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2008; 84 (1): 61-72.
24. Patel JM, Block ER. Acrolein-induced injury to cultured pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993; 122 (1): 46-53.
25. Shimokawa A, Kunitake T, Takasaki M, Kannan H. Differential effects of anesthetics on sympathetic nerve activity and arterial baroreceptor reflex in chronically instrumented rats. *J Auton Nerv Syst*. 1998; 72 (1): 46-54.
26. Fluckiger JP, Sonnay M, Boillat N, Atkinson J. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agents in the normotensive rat. *Eur J Pharmacol*. 1985; 109 (1): 105-9.
27. Souza HC, De Araújo JE, Martins-Pinge MC, Cozza IC, Martins-Dias DP. Nitric oxide synthesis blockade reduced the baroreflex sensitivity in trained rats. *Auton Neurosci*. 2009; 150 (1-2): 38-44.
28. Waki H, Katahira K, Polson JW, Kasparov S, Murphy D, Paton JF. Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats. *Exp Physiol*. 2006; 91 (1): 201-13.