

Efectos de la Administración de Betabloqueante en la Remodelación Ventricular Inducida por el Tabaquismo en Ratas

Daniella R. Duarte, Lucienne C. Oliveira, Marcos F. Minicucci, Paula S. Azevedo, Beatriz B. Matsubara, Luiz S. Matsubara, Álvaro O. Campana, Sergio A. R. Paiva, Leonardo A. M. Zornoff

Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP - Brasil

Resumen

Fundamento: Aún se desconoce el rol del sistema adrenérgico en la remodelación inducida por el tabaquismo.

Objetivo: Investigar la influencia del propranolol en la remodelación inducida por la exposición al humo del cigarrillo.

Métodos: Se dividieron las ratas en tres grupos: 1) C, n=10 - animales control; 2) F, n=10 - animales expuestos al humo de cigarrillo; 3) BB, n=10 - animales expuestos al humo de cigarrillo y que recibieron propranolol (40 mg/kg/día). Tras dos meses, los animales fueron sometidos a estudio ecocardiográfico y morfométrico. Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (promedio \pm desviación estándar) o Kruskal-Wallis (mediana e intervalo intercuartil).

Resultados: El Grupo BB presentó menor frecuencia cardiaca que el Grupo F (C = 358 ± 74 lpm, F = 374 ± 53 lpm, BB = 297 ± 30 ; P = 0,02). El Grupo F presentó mayores diámetros diastólicos (C = $18,6 \pm 3,4$ mm/kg, F = $22,8 \pm 1,8$ mm/kg, BB = $21,7 \pm 1,8$ mm/kg; P = 0,003) y sistólicos (C = $8,6 \pm 2,1$ mm/kg, F = $11,3 \pm 1,3$ mm/kg, BB = $9,9 \pm 1,2$ mm/kg; P = 0,004) del ventrículo izquierdo (VI), ajustado al peso corporal (PC) y tendencia de menor fracción de eyección (C = $0,90 \pm 0,03$, F = $0,87 \pm 0,03$, BB = $0,90 \pm 0,02$; P = 0,07) que el Grupo C. El Grupo BB presentó tendencia de menor relación VI/PC que el Grupo F (C = 1,94 (1,87 - 1,97), F = 2,03 (1,9-2,1) mg/g, BB = 1,89 (1,86-1,94); P = 0,09).

Conclusión: La administración de propranolol atenuó algunas variables de la remodelación ventricular inducida por la exposición al humo del cigarrillo en ratas. (Arq Bras Cardiol 2009;92(6):462-466)

Palabras clave: Beta-antagonistas adrenergicos/administración y dosificación, remodelación/remodelamiento ventricular, tabaquismo, ratas.

Introducción

Se puede definir la remodelación cardiaca como variaciones en el tamaño, masa, geometría, composición y función del corazón. Ese proceso ocurre en respuesta a diversos estímulos, incluso infarto de miocardio, hipertensión arterial sistémica, enfermedad valvular y mutaciones genéticas¹⁻³. Inicialmente, la remodelación es el proceso adaptativo compensatorio, desde que las alteraciones morfológicas puedan restaurar o preservar la función cardiaca en respuesta a diferentes agresiones. Crónicamente, sin embargo, el proceso de remodelación resulta en caída progresiva de la función ventricular, señales y síntomas de insuficiencia cardiaca y muerte¹⁻³.

Recientemente, diversos estudios mostraron que, en el modelo de rata, la exposición al humo del cigarrillo resulta en remodelación cardiaca, caracterizada por aumento de la

cavidad ventricular izquierda, hipertrofia de los miocitos y descenso de la función ventricular⁴⁻⁹. Sin embargo, por ser determinados, los mecanismos implicados en ese fenómeno todavía permanecen. Entre los mecanismos implicados en la modulación de las alteraciones funcionales y morfológicas presentes en diferentes modelos de agresión, la activación del sistema adrenérgico parece desempeñar un rol destacado^{10,11}. De esa manera, los estudios ya mostraron que el empleo de betabloqueantes atenúa la remodelación cardiaca en diferentes modelos experimentales y clínicos¹². Sin embargo, los efectos de la administración de betabloqueantes en la remodelación inducida por la exposición al humo del cigarrillo no se conocen aún.

Por lo tanto, este estudio tuvo por objeto investigar la influencia de la administración de propranolol en la remodelación ventricular inducida por la exposición al humo de cigarrillo en ratas.

Métodos

La Comisión de Ética en Experimentación Animal de la Facultad de Medicina de Botucatu aprobó el protocolo experimental del presente trabajo, en conformidad con los

Correspondencia: Leonardo Antônio Mamede Zornoff •

Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Clínica Médica,

Rubião Jr, 18618-000, Botucatu, SP - Brasil

E-mail: lzornoff@fmb.unesp.br, lzornoff@cardiol.br

Artículo recibido el 05/03/08; revisado recibido el 29/05/08; aceptado el 09/07/08.

Principios Éticos en la Experimentación Animal, adoptados por el Colegio Brasileño de Experimentación Animal.

Protocolo y grupos experimentales

Se dividieron a las ratas Wistar, machos, pesando entre 200g y 230g, en tres grupos experimentales:

1) Grupo C, n=10 - conformado por animales no expuestos al humo del cigarrillo;

2) Grupo F, n=10 - conformado por los animales expuestos al humo de cigarrillo por período de dos meses;

3) Grupo BB, n=10 - conformado por los animales expuestos al humo de cigarrillo por período de dos meses y que recibieron propranolol (40 mg/kg/día) disuelto en el agua de beber. Estudio previo evidenció que esa dosis posee efectos biológicos en el modelo de la rata¹³. Como la medicación estaba diluida en agua, se realizó el control diario de la ingestión de ración y agua por los animales.

La exposición al humo

Para exponerse a los animales al humo del cigarrillo, se utilizó el método propuesto por Wang et al¹⁴, ya estandarizado en nuestro laboratorio⁴⁻⁹. Al fin del período de estudio experimental, los animales fueron expuestos al humo de 40 cigarrillos/día. Con esa metodología, la exposición al humo del cigarrillo resulta en remodelación cardíaca y empeoramiento funcional⁴⁻⁹.

Presión sistólica de la cola

La medición de la presión arterial sistólica (PAS) de la cola se llevó a cabo en dos semanas antes del sacrificio. Los animales fumadores no fueron sometidos a la exposición al humo del cigarrillo por período de 24 horas antes de la toma de los valores. Se empleó el plestimógrafo de cola, constituido por un polígrafo (Byo-Sistem PE 300, NARCO) con sensor colocado en la región proximal de la cola y un esfigmomanómetro electrónico, posibilitando así el registro gráfico de la presión arterial. Se calentaron a los animales en caja de madera a 37°C, con el calor generado por dos lámparas de filamentos, por 4 minutos, y transferidos para un soporte cilíndrico de hierro, específicamente dibujado para permitir la completa exposición de la cola del animal. En la región proximal de la cola se colocó el sensor (KSM-micrófono) conectado al plestimógrafo.

Evaluación morfológica y funcional por el ecocardiograma

Tras 24 horas del final del período de observación, los animales fueron sometidos al estudio ecocardiográfico. Se empleó el equipo de Philips (modelo TDI 5500) dotado de transductor multifrecuencial hasta 12 MHz. Se tomaron las medidas de las estructuras cardíacas de acuerdo con los requisitos de la *American Society of Echocardiography*¹⁵. El mismo observador hizo las mediciones, sin conocer cuáles grupos pertenecían los animales.

Estudio morfométrico

Tras el estudio ecocardiográfico, se sacrificaron a los animales mediante administración de pentobarbital. La

relación entre el peso de los ventrículos (izquierdo y derecho), ajustado por el peso corporal de los animales, se utilizó como parámetro de hipertrofia miocárdica^{16,17}. Las mediciones se llevaron a cabo por el mismo observador, sino conocer cuales grupos pertenecían los animales.

Método estadístico

Las comparaciones se realizaron por medio de la ANOVA de una vía, complementadas por la prueba de Tukey, cuando los datos presentaron distribución normal. Cuando los datos no presentaron distribución normal, las comparaciones entre los grupos se llevaron a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis. Los datos fueron expresados en promedio \pm desviación estándar (para distribución normal) o mediana con el percentil 25 y el percentil 75 (para distribución no normal). El nivel de significancia fue del 5%. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa SigmaStat for Windows v3.5 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Resultados

Respecto a la frecuencia cardíaca, los animales del Grupo BB presentaron menores valores con relación a los animales fumadores (C = 358 \pm 74 lpm, F = 374 \pm 53 lpm, BB = 297 \pm 30 lpm; P = 0,02). Por otro lado, no observamos diferencia significativa en la PAS de la cola entre los animales de los tres grupos (C = 117 (110-120) mmHg, F = 127 (110-140) mmHg, BB = 117 (115-120) mmHg; P = 0,142).

Los datos del estudio ecocardiográfico están en la Tabla 1. Los análisis morfológicos mostraron que los animales del Grupo F presentaron mayores diámetros diastólicos del ventrículo izquierdo (VI), ajustados al peso corporal (PC), en relación con los animales control (C = 18,6 \pm 3,4 mm/kg, F = 22,8 \pm 1,8 mm/kg, BB = 21,7 \pm 1,8 mm/kg; P = 0,003). Por otro lado, el grupo BB presentó valores intermedios de esa variable, ya que no hubo diferencia en comparación a los valores tanto de C como de F.

El análisis funcional evidenció que los animales del Grupo F presentaron mayores diámetros sistólicos del ventrículo izquierdo, ajustado al PC (C = 8,6 \pm 2,1 mm/kg, F = 11,3 \pm 1,3 mm/kg, BB = 9,9 \pm 1,2 mm/kg; P = 0,004) con relación a los animales control. Nuevamente, el Grupo BB presentó valores intermedios de esa variable, ya que no hubo diferencia en comparación a los valores tanto de C como de F. De igual manera, hubo tendencia de menor fracción de eyección (C = 0,90 \pm 0,03 %, F = 0,87 \pm 0,03 %, BB = 0,90 \pm 0,02 %; P = 0,07) en el Grupo F en comparación con C y tendencia de menor porcentaje de acortamiento (C = 54 \pm 5, F = 50 \pm 4, BB = 54 \pm 4; P = 0,09) en el Grupo F, que los animales de los Grupos C y BB. No fueron encontradas diferencias con relación a las otras variables.

En lo que toca a las variables morfométricas cardíacas (Tabla 2), los animales del grupo BB presentaron tendencia de menores valores del peso del VI ajustado por el peso del cuerpo de los animales (VI/PC), con relación a los animales fumadores (C = 1,94 (1,87 - 1,97) mg/g, F = 2,03 (1,9-2,1) mg/g, BB = 1,89 (1,86-1,94) mg/g; P = 0,09). No se detectaron diferencias respecto a las otras variables.

Tabla 1 - Datos ecocardiográficos

Variables	C (n=10)	F (n=10)	BB (n=10)
AI/PC (mm/g)	10,2 ± 1,6	11,7 ± 1,7	12,8 ± 1,4
DDVI/PC (mm/kg)	18,7 ± 3,4	22,8 ± 1,8*	21,7 ± 1,8
DSVI/PC (mm/kg)	8,6 ± 2,1	11,3 ± 1,4*	9,9 ± 1,9
HDPP (mm)	1,50 ± 0,41	1,29 ± 0,2	1,41 ± 0,1
HDPP/DDVI	0,20 (0,17-0,21)	0,18 (0,17-0,22)	0,20 (0,17-0,21)
% ac	54 ± 5	50 ± 4#	54 ± 4
FI	0,90 ± 0,03	0,87 ± 0,03#	0,90 ± 0,02
E/A	1,63 ± 0,35	1,69 ± 0,31	1,84 ± 0,15

C - animales no expuestos al humo del cigarrillo; F - animales expuestos al humo del cigarrillo por dos meses; BB - animales expuestos al humo del cigarrillo y tratados con propranolol por dos meses; PC - peso corporal de la rata; AI - diámetro del atrio izquierdo; DDVI - diámetro diastólico del ventrículo izquierdo; DSVI - diámetro sistólico del ventrículo izquierdo; HDPP - espesor diastólico de la pared posterior; % ac - porcentaje de acortamiento; FE - fracción de eyección; E/A - relación entre las ondas E y A evaluadas del flujo transmitral. Los datos fueron expresados en promedio ± desviación estándar o mediana e intervalo intercuartil. *p<0,05 vs C; # p<0,1 vs C y BB.

Tabla 2 - Datos morfométricos

Variables	C (n=10)	F (n=10)	BB (n=10)
PC (g)	385 ± 46	343 ± 38	349 ± 34
VI (mg)	0,69 (0,65-0,83)	0,66 (0,64-0,81)	0,66 (0,61-0,73)
VII/PC (mg/g)	1,94 (1,87-1,97)	2,1 (1,9-2,1)	1,89 (1,86-1,94)*
VD (mg)	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,03
VD/PC (mg/g)	0,53 ± 0,06	0,57 ± 0,09	0,55 ± 0,06

C - animales no expuestos al humo del cigarrillo; F - animales expuestos al humo del cigarrillo por dos meses; BB - animales expuestos al humo del cigarrillo y tratados con propranolol por dos meses; PC - peso corporal de la rata; VI - peso del ventrículo izquierdo; VD - peso del ventrículo derecho. Los datos fueron expresados en promedio ± desviación estándar o mediana e intervalo intercuartil. *p<0,1 vs F.

Discusión

Este estudio tuvo por objeto analizar el efecto de la administración de betabloqueante en el proceso de remodelación ventricular, inducido por la exposición al humo de cigarrillo en ratas. Los resultados mostraron que el bloqueo de los receptores adrenérgicos beta fue seguido de atenuación de algunas alteraciones morfológicas y funcionales causadas por el tabaquismo.

Alteraciones de la geometría, volumen, masa y constitución del corazón, en respuesta a la agresión miocárdica o a las alteraciones en las condiciones de la carga, han sido estudiadas con el nombre de remodelación cardíaca¹⁻³. Se acepta que la hipertrofia y el aumento de la cavidad desempeñan rol importante en el proceso de remodelación. Nuestros datos confirman estudios previos⁴⁻⁹ en que el tabaquismo fue seguido por aumento de la cavidad ventricular en el modelo de la rata. Adicionalmente, uno de los hallazgos importantes

del presente estudio fue que la administración de propranolol, un betabloqueante no selectivo (con acción y receptores β_1 y β_2) resultó en valores intermediarios del diámetro diastólico del VI, en comparación a los animales fumadores y controles. Inicialmente, no fueron encontradas diferencias entre los animales BB y los fumadores. Sin embargo, los valores de BB también no fueron diferentes de los animales control. Así, nuestros datos permiten sugerir que el propranolol no previno, sino atenuó el aumento de la cavidad inducido por el tabaquismo.

Otro aspecto relevante se refiere al hecho de que, clásicamente, el proceso de remodelación está asociado a diferentes grados de disfunción ventricular. Inicialmente, las alteraciones morfológicas características de la remodelación se pueden considerar como adaptativas ante las nuevas condiciones de carga a las cuales el corazón agredido se somete. Sin embargo, crónicamente, pueden ocurrir alteraciones genéticas, moleculares y celulares cardíacas que son capaces de conllevar el empeoramiento progresivo de la función ventricular¹⁻³. Nuestros datos están en conformidad con ese concepto, ya que el aumento del diámetro diastólico del VI con el tabaquismo fue seguido de empeoramiento de índices de la función ventricular izquierda, como el diámetro sistólico final, fracción de eyección y porcentaje de acortamiento del VI. Un aspecto a tenerse en cuenta está referido al hecho de que el propranolol resultó en valores intermediarios entre los animales fumadores y los animales control. Así, podemos inferir que la administración de betabloqueante no previno, sino atenuó las alteraciones funcionales inducidas por el tabaquismo. Ese efecto es todavía más relevante teniéndose en cuenta que los animales tratados con propranolol presentaban menor frecuencia cardíaca. Fisiológicamente, la reducción de la frecuencia cardíaca está asociada con la disminución de los valores de los índices de eyección ventricular, independientemente de variaciones del estado contráctil del miocardio.

Los mecanismos responsables de las alteraciones morfológicas y funcionales cardíacas, inducidas por la exposición al humo del cigarrillo no están completamente aclarados. Hay evidencias suficientes mostrando que el monóxido de carbono está asociado con apoptosis, disfunción cardíaca, hipertrofia y dilatación de la cámara ventricular izquierda tras el infarto experimental^{18,19}. Trabajo anterior en el modelo de rata mostró que la administración de antioxidante atenuó la remodelación inducida por el tabaquismo, sugiriendo que el estrés oxidativo tiene participación fisiopatológica en las alteraciones cardíacas provocadas por el humo⁶. De otra manera, estudios previos, con períodos de observación mayores que el del presente trabajo (4 y 6 meses), no observaron alteraciones en el PO₂ y en el porcentaje de saturación de la hemoglobina por el O₂^{5,9}. Así, hipoxemia crónica y alteraciones en la viscosidad sanguínea secundarias la hipoxia, potenciales candidatos que podrían explicar los resultados de nuestro estudio, probablemente no tiene participación en la fisiopatología de las alteraciones inducidas por el cigarrillo. De igual manera, no fue detectada asociación entre la remodelación cardíaca inducida por el tabaquismo y la activación de metaloproteinasas 2 y 9⁸. Otro mecanismo potencial está asociado al hecho de

que datos anteriores mostraron que la administración de nicotina en ratas conscientes resultó en vasoconstricción. Así, la simpatectomía abolió los efectos vasoactivos de la nicotina²⁰. En el mismo modelo, el humo de cigarrillo causó elevación de los niveles de endotelina-1²¹ y la administración de antagonista selectivo de los receptores A de la endotelina atenuó la respuesta de presión inducida por la nicotina²². En otro estudio, la administración de nicotina disminuyó la síntesis de prostaciclina por el endotelio vascular²³. Adicionalmente, la administración de antagonista de la vasopresina atenuó la vasoconstricción inducida por nicotina en los vasos sanguíneos de la piel²⁴. En nuestro trabajo, sin embargo, los animales expuestos al humo del cigarrillo y tratados con propranolol no presentaron diferencias en los niveles de presión arterial en relación a los animales no tratados. De esa manera, nuestros datos sugieren que la atenuación de la remodelación causada por el propranolol no fue resultado de los efectos de la medicación en la presión arterial.

Debemos tener en cuenta que la activación neurohumoral podría, por mecanismos autocrinos y paracrinos, resultar en alteraciones en vías de señalización intracelulares^{12,25}. La clásica subdivisión de receptores β -adrenergicos establece tres subtipos: β_1 , β_2 y β_3 que activan la adenilciclase, por medio de la proteína G, aumentando los niveles de AMP cíclico, con posterior estímulo de la proteína quinasa A. Ésta, a su vez, causa la fosforilación de diversas proteínas que modulan la contractilidad (por ejemplo: canales L de calcio, fosfolamban, troponina I, receptores de rianodina, SERCA2a) y la remodelación cardiaca (fosfatidil inositol 3-quinasa, factores de crecimiento, ERK, quinasas activadas por mitógenos, entre otros). Así, el bloqueo de receptores β -adrenergicos está asociado a una menor remodelación secundaria a varios estímulos, tanto en estudios experimentales como clínicos^{12,25}. Nuestros datos están en conformidad con esas evidencias, ya que hubo atenuación de la remodelación inducida por la exposición al humo del cigarrillo. Tomándose en consideración que no hubo diferencia en los niveles de presión entre los animales de los tres grupos, nuestros datos sugieren que la atenuación de la remodelación causada por el propranolol probablemente implicó vías de señalización intracelulares moduladas por los receptores β -adrenergicos que, sin embargo, probablemente no fueron como consecuencia de efectos hemodinámicos.

Un aspecto relevante del presente trabajo está referido a las implicaciones clínicas de los nuestros resultados. Hay evidencias de que el tabaquismo puede resultar en alteraciones morfológicas y funcionales cardiacas en humanos. Por ejemplo, en el estudio observacional CARDIA, fumadores tuvieron mayor masa ventricular izquierda, en comparación con no fumadores, evaluados por ecocardiograma²⁶. Adicionalmente, la inhalación aguda del humo de cigarrillo fue seguido por disturbios de la función diastólica, en pacientes con documentada enfermedad arterial coronaria^{27,28}. De ese modo, hay la posibilidad de que la administración de betabloqueante pueda interferir en las alteraciones inducidas por el tabaquismo también en humanos.

Por fin, nuestros resultados se deben analizar teniéndose en cuenta potenciales limitaciones. En primer lugar, las variables analizadas fueron solo parámetros ecocardiográficos y de peso. Nuestro trabajo no evaluó otras variables implicadas en el proceso de remodelación como, por ejemplo, contenido de colágeno intersticial. Otro aspecto es que apenas algunas de las variables analizadas fueron estadísticamente diferentes. Ese hecho sucedió, probablemente, como resultado del pequeño número de nuestra muestra. Sin embargo, pese a esas limitaciones, creemos que las variables analizadas fueron suficientes para caracterizar el proceso de remodelación inducido por el tabaquismo y revelar efectos biológicos con el propranolol.

En conclusión, la administración de propranolol no previno, sino atenuó algunas de las variables de la remodelación ventricular inducida por la exposición al humo del cigarrillo en ratas.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio no tuvo fuentes de financiación externas.

Vinculación Académica

No hay vinculación de este estudio a programas de postgrado.

Referencias

1. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.* 2001; 110: 375-465.
2. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81: 1161-72.
3. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 569-82.
4. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol.* 2003; 81: 221-8.
5. Castardeli E, Paiva SAR, Matsubara BB, Matsubara L S, Minicucci MF, Azevedo PS, et al. Chronic cigarette smoke exposure results in cardiac remodeling and impaired ventricular function in rats. *Arq Bras Cardiol.* 2005; 84: 320-4.
6. Zornoff LAM, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Dal Pai-Silva, et al. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-exposure in rats. *Tox Sci.* 2006; 90: 259-66.
7. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS,

- Campana AO, et al. Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86: 276-82.
8. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Tobacco smoke-induced left ventricular remodeling is not associated with metalloproteinase-2 or -9 activation. *Eur J Heart Fail.* 2007; 9: 1081-5.
9. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Med Sci Monit.* 2008; 14 (3): BR62-66.
10. Plante E, Lachance D, Champetier S, Drolet MC, Roussel E, Arsenault M, et al. Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294 (4): H1888-95.
11. Malfato G, Branzi G, Ciambelotti F, Valli P, Bizzi C, Fachini M. Different ventricular remodeling and autonomic modulation after long-term beta-blocker treatment in hypertensive, ischaemic and idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med.* 2007; 8: 840-5.
12. Perrino C, Rockman HA. Reversal of cardiac remodeling by modulation of adrenergic receptors: a new frontier in heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 2007; 22: 443-9.
13. Yaoita H, Sakabe H, Maehara K, Maruyama Y. Different effects of carvedilol, metoprolol, and propranolol on left ventricular remodeling after coronary stenosis or after permanent coronary occlusion in rats. *Circulation.* 2002; 105: 975-80.
14. Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 60-6.
15. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman AE. The Committee on M-Mode Standardization of the American Society of Echocardiography, Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978; 58: 1072-83.
16. Zornoff LA, Paiva SA, Matsubara BB, Matsubara LS, Spadaro J. Combination therapy with angiotensin converting enzyme inhibition and AT1 receptor inhibitor on ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2000; 5: 203-9.
17. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H1534-9.
18. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *J Cell Mol Med.* 2006; 10: 672-86.
19. Sørhaug S, Steinshamn S, Nilsen OG, Waldum HL. Chronic inhalation of carbon monoxide: effects on the respiratory and cardiovascular system at doses corresponding to tobacco smoking. *Toxicology.* 2006; 228: 280-90.
20. Marano G, Ramirez A, Mori I, Ferrari AU. Sympathectomy inhibits the vasoactive effects of nicotine in conscious rats. *Cardiovasc Res.* 1999; 42: 201-5.
21. Haak T, Jungmann E, Raab C, Usadel KH. Elevated endothelin-1 levels after cigarette smoking. *Metabolism.* 1994; 43: 267-9.
22. Tanus-Santos JE, Sampaio RC, Hyslop S, Franchini KG, Moreno Jr H. Endothelin ETA receptor antagonism attenuates the pressor effects of nicotine in rats. *Eur J Pharmacol.* 2000; 396: 33-7.
23. Klein LW. Cigarette smoking, atherosclerosis and the coronary hemodynamic response: a unifying hypothesis. *J Am Coll Cardiol.* 1984; 4: 972-4.
24. Khosla S, Laddu A, Ehrenpreis S, Somberg JC. Cardiovascular effects of nicotine: relation to deleterious effects of cigarette smoking. *Am Heart J.* 1994; 127: 1669-72.
25. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res.* 2003; 93: 896-906.
26. Gidding SS, Xie X, Liu K, Manolio T, Flack JM, Gardin JM. Cardiac function in smokers and nonsmokers: the CARDIA study. The Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26: 211-6.
27. Kyriakides ZS, Kremastinos DT, Rentoukas E, Mavrogheni S, Kremastinos DJ, Toutouzas P. Acute effects of cigarette smoking on left ventricular diastolic function. *Eur Heart J.* 1992; 13: 743-8.
28. Stork T, Eichstadt H, Mockel M, Bortfeldt R, Müller R, Hochrein H. Changes of diastolic function induced by cigarette smoking: an echocardiographic study in patients with coronary artery disease. *Clin Cardiol.* 1992; 15: 80-6.