

Looking for early indicators of vascular modification in young healthy tobacco smokers

.....
Procura de indicadores precoces de modificação vascular em jovens saudáveis
fumadores de tabacoSérgio Fallone Andrade   & Luís Monteiro Rodrigues **Keywords:** Cigarette smoking, young healthy smokers, vascular impact, reactive hyperemia (RH), early predictors of vascular modification**Palavras-chave:** consumo de cigarros, jovens fumadores saudáveis, impacto vascular, hiperemia reactiva (HR), preditores precoces de modificação vascular**To Cite:**Andrade, S. F. & Monteiro Rodrigues, L. (2024) Looking for early indicators of vascular modification in young healthy tobacco smokers. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 21(1), 1-12. [10.19277/bbr.21.1.333](https://doi.org/10.19277/bbr.21.1.333)

CBIOS - Research Center for Biosciences & Health Technologies, Lusófona University, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:
sergio.andrade@ulusofona.ptReceived / Recebido: 13/03/2024
Accepted / Aceite: 23/04/2024**Abstract**

Cigarette smoking is a main risk factor for cardiovascular disease but early indicators of damage specially in young smokers with no clinical evidence of impairment are lacking. Our study identifies adaptive responses in young smokers following a Reactive Hyperemia (RH) maneuver and compares those responses with an equivalent non-smoker group. The study respected all principles of good clinical practice, involved 42 healthy volunteers (21 smokers, 21 non-smokers), with similar anthropometric data, except for smoking habits. Smokers were mostly (17/21) mild, according with the calculated smoking index, and had followed this regular practice for 11.1 ± 4.5 years. RH was obtained by applying a suprasystolic pressure to one of the participants' arms for two minutes. Perfusion was measured in the third finger on the ipsilateral side. Perfusion early recovery after occlusion was significantly faster in non-smokers ($***p < 0.0001$) compared with smokers. These differences were attributed to smoking, suggesting that even in the absence of any clinical expression, the reflex adaptive responses evoked by RH in both groups are altered. These results justify further studies to better understand the early subclinical impacts of smoking on healthy individuals.

Resumo

O consumo de cigarros é um dos principais factores de risco para as doenças cardiovasculares mas, especialmente em jovens fumadores faltam indicadores precoces de dano na ausência de sinais clínicos de comprometimento. O nosso estudo identifica e compara as respostas adaptativas em jovens fumadores e em não fumadores após uma manobra de Hiperemia Reactiva (HR). O estudo obervou todos os princípios da boa prática clínica, envolvendo 42 voluntários saudáveis (21 fumadores, 21 não fumadores), em tudo semelhantes, exceto no que diz respeito aos hábitos tabágicos. Os fumadores eram maioritariamente (17/21) ligeiros, de acordo com o *smoking index* (índice de tabagismo) calculado, tendo iniciado este consumo regular há $11,1 \pm 4,5$ anos. A HR foi obtida através da aplicação de uma pressão supra-sistólica num dos braços de cada participant durante dois minutos. A perfusão foi medida no terceiro dedo do lado ipsilateral. A recuperação precoce da perfusão após a oclusão foi significativamente mais rápida nos não fumadores ($***p < 0,0001$) em comparação com os fumadores. Estas diferenças foram atribuídas ao tabagismo, sugerindo que, mesmo na ausência de qualquer expressão clínica, as respostas adaptativas reflexas evocadas pela HR em ambos os grupos são alterados. Estes resultados justificam a realização de mais estudos para melhor compreender os impactos subclínicos precoces do tabagismo em indivíduos saudáveis.

Introduction

Tabagism remains the leading risk factor for cardiovascular disease (1). Cigarette smoke contains a complex mix of a wide variety of different components, estimated at more than seven thousand chemical compounds that include more than thirty carcinogens, multiple reactive species (oxygen, nitrogen), and volatile sulfur compounds (2,3). While the correlation between smoking and many other pathological processes such as atherosclerosis is well established, other studies continue to try to better understand the mechanisms involved in its pathogenesis. Nicotine, carbon monoxide, and ROS represent principal roles in the progression of smoking-induced atherosclerosis (4,5) and endothelial dysfunction is one of the most significant detrimental effects of smoking (6). Factors contributing to endothelial dysfunction include reduced bioavailability of nitric oxide, increased levels of superoxide anion, and endothelin release (7,8). Although smoking is recognised as a major risk factor for vascular health being linked to the initial onset of pathophysiological processes known to start in adolescent and young adults (1) there is still lack of measurable early predictors due in part, to a limited understanding of the mechanisms involved.

A practical accessible way to approach *in vivo* microvascular function is Reactive Hyperemia (RH), which includes the Post-Occlusive Reactive Hyperemia (POHR) (9,10). This maneuver typically involves the induction of a temporary ischemia by occlusion of a major vessel such as the brachial artery in the upper limb (11,12). When occlusion ends a measurable period of reactive reperfusion allows the quantitative description of the adaptive response. Some studies suggested that this approach has an interesting prognostic value and could become an outcome measure to assess microcirculatory function (12,13). However, it is not commonly used in the clinical practice.

In the last years, our research group has been dedicated to studying microcirculation physiology and mechanisms involved in RH adaptive response (14–16). Thus, with the goal to better understand the effects of smoking in young healthy populations, the present study was designed to compare the microvascular adaptation and response following the PORH maneuver between healthy young smokers and non-smokers.

Introdução

O tabagismo continua a ser o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares (1). O fumo do cigarro contém uma mistura tão vasta quanto complexa de diferentes componentes, estimada em mais de sete mil compostos químicos que incluem mais de trinta carcinogêneos, múltiplas espécies reativas (ER) (oxigênio, azoto) e compostos sulfurados voláteis (2,3). Embora a correlação entre o tabagismo e muitos outros processos patológicos, como a aterosclerose, esteja bem estabelecida, outros estudos continuam a tentar compreender melhor os mecanismos envolvidos na sua patogênese. A nicotina, o monóxido de carbono e as ERs desempenham papéis principais na progressão da aterosclerose induzida pelo tabaco (4,5) e a disfunção endotelial é um dos efeitos prejudiciais mais significativos do tabaco (6). Os factores que contribuem para a disfunção endotelial incluem a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, o aumento dos níveis de anião superóxido e a libertação de endotelina (7,8). Embora o tabagismo seja reconhecido como um importante fator de risco para a saúde vascular, estando ligado ao início de processos fisiopatológicos que se sabe começarem na adolescência e nos jovens adultos (1), ainda não existem indicadores precoces mensuráveis devido, em parte, a uma compreensão limitada dos mecanismos envolvidos.

Uma forma prática e acessível de abordar a função microvascular *in vivo* é através da Hiperemia Reactiva (HR), que inclui a Hiperemia Reactiva Pós-Oclusiva (HRPO) (9,10). Esta manobra envolve tipicamente a indução de uma isquemia temporária através da oclusão de um vaso principal como a artéria braquial no membro superior (11,12). Quando a oclusão termina, um período mensurável de reperusão reactiva permite a descrição quantitativa da resposta adaptativa. Alguns estudos sugerem que esta abordagem tem um valor prognóstico interessante e pode tornar-se uma medida de resultado para avaliar a função microcirculatória (12,13). No entanto, não é comumente utilizada na prática clínica.

Nos últimos anos, o nosso grupo de investigação tem-se dedicado ao estudo da fisiologia da microcirculação e dos mecanismos envolvidos na resposta adaptativa da HR (14-16). Assim, com o objetivo de melhor compreender os efeitos do tabagismo em populações jovens e saudáveis, o presente estudo foi concebido para comparar a adaptação e resposta microvascular após a manobra de HRPO entre jovens saudáveis fumadores e não fumadores.

Material and Methods

Volunteers

A convenience sample of 42 healthy volunteers (21 smokers; 21 non-smokers) of both sexes, selected from the university community (Lusófona University), were included in the study following specific inclusion /non-inclusion criteria adapted for these types of studies (16).

All study participants were normotensive and exhibited no signs of vascular dysfunction, as assessed by the ankle-brachial index (ABI) (17). They also reported similar levels of physical activity. None of the participants were on regular medication or dietary supplements, and they were instructed to refrain from consuming caffeinated or other vasoactive beverages for 24 hours before the experiments. The definition of smoker involved the daily consumption of at least ten cigarettes and a confirmed self-reported consumption habit for at least three years. We also calculated the smoking index to better characterize our smokers (18). This descriptor was obtained by multiplying the number of cigarettes smoked per day by the number of years of smoking and considers three categories of smokers - mild (smoking index ≤ 200), moderate ($200 < \text{smoking index} < 400$), and severe smoking (smoking index ≥ 400). The general characteristics of participants are summarized in Table 1.

All procedures respected the principles of good clinical practice stated in the Declaration of Helsinki and its subsequent amendments (19). Written informed consent was received from all subjects involved in the study, while the experimental protocol was previously approved by the Ethics Committee of the School of Health Sciences and Technologies, Lusófona University (CE.ECTS/P05-21).

Experimental

Volunteers were allowed to adapt to the laboratory temperature, humidity, and light for 20–30 minutes before measurement. LDF sensors were applied in the ipsilateral hand (ventral face of ring finger) to register perfusion. LDF signal, expressed in arbitrary Perfusion Units (PUs), was obtained with a Perimed PF5010 system (Perimed, Järfälla, Sweden), which also continuously monitored skin surface temperature (PF 5020 Temp Unit).

Material e métodos

Voluntários

Foi incluída no estudo uma amostra de conveniência de 42 voluntários saudáveis (21 fumadores; 21 não fumadores), de ambos os sexos, seleccionados na comunidade universitária (Universidade Lusófona), seguindo critérios de inclusão/não inclusão específicos adaptados a este tipo de estudos (16).

Todos os participantes do estudo eram normotensos e não apresentavam sinais de disfunção vascular, conforme avaliado pelo índice tornozelo-braço (ITB) (17). Também relataram níveis semelhantes de actividade física. Nenhum dos participantes tomava medicação regular ou suplementos alimentares, sendo instruídos a não consumir bebidas com cafeína ou outras bebidas vasoactivas nas 24 horas antes das experiências. A definição de fumador envolveu o consumo diário de pelo menos dez cigarros e um hábito de consumo auto-relatado confirmado durante pelo menos três anos. Calculámos também o índice de tabagismo para melhor caracterizar os fumadores (18). Este descritor foi obtido multiplicando o número de cigarros fumados por dia pelo número de anos de tabagismo, e considera três categorias de fumadores - fumadores ligeiros (índice de fumadores ≤ 200), moderados ($200 < \text{índice de fumadores} < 400$) e fumadores graves (índice de fumadores ≥ 400). As características gerais dos participantes estão resumidas na Tabela 1.

Todos os procedimentos respeitaram os princípios de boas práticas clínicas estabelecidos na Declaração de Helsínquia e suas alterações subsequentes (19). Foi obtido o consentimento informado por escrito de todos os sujeitos envolvidos no estudo, tendo o protocolo experimental sido previamente aprovado pela Comissão de Ética da Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona (CE.ECTS/P05-21).

Experimental

Os voluntários passaram por um período de adaptação à temperatura, humidade e luz do laboratório durante 20-30 minutos antes das medições. Foram aplicados sensores de LDF na mão ipsilateral (face ventral do dedo anelar) para registar a perfusão. O sinal LDF, expresso em Unidades de Perfusão (UPs) arbitrárias, foi obtido com um sistema Perimed PF5010 (Perimed, Järfälla, Suécia), que também monitorizou continuamente a temperatura da superfície da pele (PF 5020 Temp Unit).

Table 1 - Volunteers' general characteristics.
Tabela 1 - Características gerais dos voluntários.

	Total Population / População Total (n=42)	Smoker / Fumador (n=21)	Non-Smoker / Não-fumador (n=21)	p-value / Valor de p
Sex, % (n) / Sexo, % (n)				
Women / Mulheres	64.3 (27)	67.0 (14)	62.0 (13)	0.370
Men / Homens	35.7 (15)	33.0 (7)	38.0 (8)	
Age, years / Idade, anos	30.4 ± 11.5	30.1 ± 9.0	26.4 ± 8.2	0.169
Body Mass, kg / Massa Corporal, kg	66.0 ± 14.5	71.0 ± 16.7	63.0 ± 10.3	0.069
Height, m / Altura, m	1.69 ± 0.08	1.67 ± 0.08	1.67 ± 0.09	0.453
BMI, kg/m ² / IMC, kg/m ²	23.2 ± 3.9	24.1 ± 4.3	22.1 ± 2.5	0.372
SystP, mmHg / PSist mmHg	122 ± 15	125 ± 16	118 ± 20	0.341
DiasP, mmHg / PDias mmHg	76 ± 10	83 ± 8	79 ± 7	0.489
MAP (mmHg) / PAM (mmHg)	90 ± 9	95 ± 10	91 ± 8	0.527
ABI / ITB	1.11 ± 0.07	1.12 ± 0.09	1.09 ± 0.07	0.567
Physical Activity (h/week) / Actividade Física (h/semana)	2.03 ± 0.71	1.95 ± 0.66	2.05 ± 0.73	0.440
Smoker (years) / Fumadores (anos)	-	11.1 ± 4.5	0.0 ± 0.0	-
Cigarette consumption per day / Consumo de cigarros diárias	-	13.1 ± 3.7	0.0 ± 0.0	-
Smoking index / Índice de tabagismo				
Mild smoking (n; Index)/ Fumador ligeiro (n; Índice)		17; 116.5 ± 38.7	-	-
Moderate smoking (n; Index) / Fumador moderado (n; Índice)		4; 276.3 ± 46.4	-	-
Severe smoking / Fumador severo (n; Índice)		0; 0.0	-	-

Data expressed as mean ± Standard Deviation (SD) or % (n) for continuous variables or categorical variables, respectively. Significance level $p < 0.05$. Student's t-test was used for comparisons between Smoker and Non-smoker groups. BMI, Body Mass Index; SYSTP, Systolic pressure; DIASP, Diastolic Pressure; ABI, Ankle-Brachial Index; MAP, Medium Arterial Pressure / Dados expressos como média ± desvio-padrão (DP) ou % (n) para variáveis contínuas ou variáveis categóricas, respetivamente. Nível de significância $p < 0,05$. O teste t de Student foi utilizado para comparações entre os grupos de fumadores e não fumadores. IMC, Índice de Massa Corporal; PSist, Pressão Sistólica; PDias, Pressão Diastólica; ITB, Índice Tornozelo-Braquial; PAM, Pressão Arterial Média.

The protocol included three phases - a baseline resting register (Phase I) ceasing with stabilization of the variable, followed by a challenge period (Phase II) involving two-minute occlusion as part of the PORH maneuver, followed by a ten-minute recovery period (Phase III). PORH was performed on one randomly chosen upper limb in each participant, using a cuff applied in the middle arm, near the elbow flexor area. After baseline acquisition, the cuff was rapidly inflated with 200 mmHg to occlude the brachial artery. This pressure was maintained for two minutes to ensure hemodynamical stabilization in the area (Figure 1). Then the cuff was rapidly deflated and perfusion recorded.

O protocolo incluiu três fases - um registo de repouso basal (Fase I) que cessou com a estabilização da variável, seguido de um período de desafio (Fase II) envolvendo dois minutos de oclusão como parte da manobra HRPO, seguido de um período de recuperação de dez minutos (Fase III). A HRPO foi realizada num membro superior escolhido aleatoriamente em cada participante, utilizando uma manga insuflável aplicada no braço médio, próximo à área flexora do cotovelo. Após a aquisição da linha de base, a manga foi rapidamente insuflada com 200 mmHg para ocluir a artéria braquial. Essa pressão foi mantida por dois minutos para garantir a estabilização hemodinâmica da área (Figura 1). Em seguida, a manga foi rapidamente esvaziada mantendo o registo contínuo de perfusão.

Blood pressure was measured with a Sphygmomanometer (Ortomed, Viseu, Portugal) by which Mean Arterial Pressure (MAP) was calculated as:

$$\text{MAP} = \text{DP} + 1/3 (\text{SP} - \text{DP})$$

where DP is the diastolic blood pressure, SP is the systolic blood pressure (20).

Statistical Analysis

Anthropometric data were presented as mean \pm standard deviation (SD). The microcirculation response after the PORH maneuver was expressed as a percentage of perfusion change between Phase I (Baseline) and Phase II (challenge) and between Phase I and Phase III (recovery). Within this phase early recovery, corresponding to first three minutes after Phase II and late recovery, corresponding to last three minutes after the end of this period, were calculated. The Kolmogorov-Smirnov normality test was applied to verify data normality. For comparisons between variables, we used the unpaired Student's t-test and one-way ANOVA for repeated measures followed by the Tukey's post hoc test. Statistical analysis was conducted using Jamovi® (Version 2.2, the Jamovi Project, Sydney, Australia), and GraphPad® prism 8 (San Diego, CA, USA) with significance set at $p < 0.05$.

A pressão arterial foi medida com um esfigmomanómetro (Ortomed, Viseu, Portugal), sendo a pressão arterial média (PAM) calculada da seguinte forma:

$$\text{PAM} = \text{PD} + 1/3 (\text{PS} - \text{PD})$$

em que PD é a pressão diastólica e PS é a pressão sistólica (20).

Análise estatística

Os dados antropométricos foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). A resposta da microcirculação após a manobra de HRPO foi expressa em percentagem de alteração da perfusão entre a Fase I (basal) e a Fase II (desafio), e entre Fase I e a Fase III (recuperação). Dentro desta fase foram calculadas a recuperação precoce, correspondente aos primeiros três minutos após a Fase II e a recuperação tardia, correspondente aos últimos três minutos após o término deste período. Para verificar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para comparações entre variáveis foi utilizado o teste t de Student não pareado e ANOVA one-way para medidas repetidas seguido do teste post hoc de Tukey. A análise estatística foi realizada com Jamovi® (Versão 2.2, Projeto Jamovi, Sydney, Austrália) e o GraphPad® prism 8 (San Diego, CA, EUA), com significância estabelecida em $p < 0,05$.

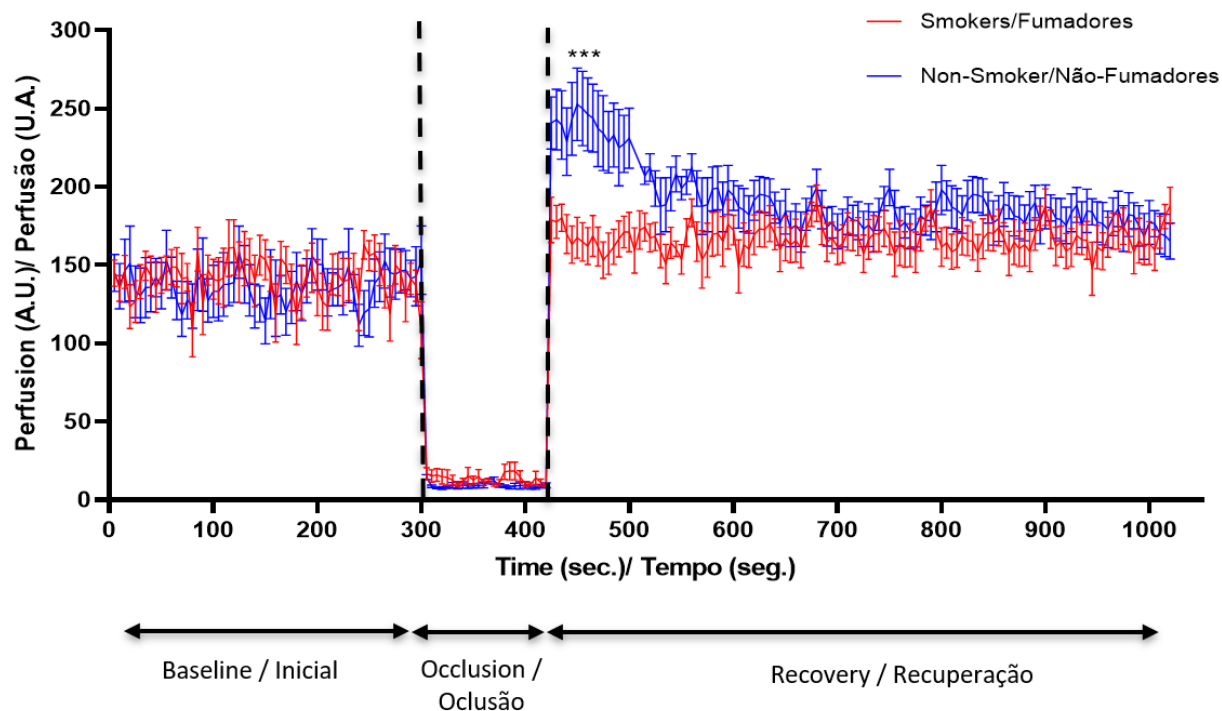


Figure 1 - Real time register of all LDF perfusion changes (both groups) during the complete experimental protocol.

Figura 1 – Registo em tempo real de todas as alterações de perfusão medidas pelo do LDF (ambos os grupos) durante todo o protocolo experimental.

Results

Our sample included 64.3% women and 35.7% men similarly represented in both smoker and non-smokers groups. No statistical differences were observed between the groups regarding age, body mass, height, the Body Mass Index (BMI), the Ankle-Brachial Index (ABI), physical activity, and blood pressure, confirming that with the exception of the smoking habit, both groups were equivalent. The smokers had begun consuming (mean) 11.1 ± 4.5 years prior to this study and, according to the smoking index classification, were mostly mild to moderate consumers (13.2 ± 3.7 cigarettes per day).

Baseline (Phase I) and challenge (Phase II) registers were equivalent in both groups. However, analyses of adaptation and recovery in Phase III (recovery after occlusion) revealed a significant ($***p < 0.0001$) higher early response (first three minutes) in the non-smoking group compared to the smoking group; with perfusion value $64.0\% \pm 13.8$ higher when compared to phase I, while in the smoking group, perfusion increased only $21.2\% \pm 9.2$, in the same conditions. In the last recovery period, both groups showed similar perfusion changes ($13.2\% \pm 3.5$ and $12.6\% \pm 2.7$ for smokers and non-smokers respectively (Table 2 and Figure 2).

Discussion

Skin microcirculation is an interesting window for the non-invasive, real-time assessment of vascular physiology and has been used to obtain various quantitative markers of cardiovascular function (11,21). In the present study, we investigate the distal effects of smoking on young healthy human skin perfusion after PORH. The main intention is to know more about the impact of the regular consumption of smoking tobacco in young people, especially when there is no evidence of any clinical compromise, to identify early measurable outcomes acting as predictors of vascular impairment.

Young smokers have been reported to likely show an aggravated health condition and risk calculation for several cardiovascular and respiratory diseases (22). Young smokers have been associated with shortness of breath, coughing, and wheezing when compared with non-smokers (22,23). Regarding cardiac function, only a few reports suggested a connection between early age smoking and a decline of cardiac function (22,24). A strong link to the development of atherosclerosis is established (22–24) and a recent

Resultados

A nossa amostra incluiu 64,3% de mulheres e 35,7% de homens, representados de forma semelhante nos grupos de fumadores e não fumadores. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos relativamente à idade, massa corporal, altura, Índice de Massa Corporal (IMC), Índice Tornozelo-Braço (ITB), atividade física e pressão arterial, confirmando que, à exceção do hábito tabágico, ambos os grupos eram equivalentes. Todos os fumadores iniciaram o consumo (em média) há $11,1 \pm 4,5$ anos e, de acordo com a classificação do índice de tabagismo, eram maioritariamente consumidores ligeiros a moderados ($13,2 \pm 3,7$ cigarros por dia).

Os registos da linha de base (Fase I) e do desafio (Fase II) foram equivalentes em ambos os grupos. No entanto, a análise da adaptação e recuperação na Fase III (recuperação após oclusão) revelou uma resposta precoce (primeiros três minutos) significativamente ($***p < 0,0001$) superior no grupo não-fumador em relação ao grupo fumador, com um valor de perfusão $64,0\% \pm 13,8$ superior em relação à fase I, enquanto no grupo fumador a perfusão aumentou apenas $21,2\% \pm 9,2$, nas mesmas condições. No último período de recuperação, ambos os grupos apresentaram alterações perfusionais semelhantes ($13,2\% \pm 3,5$ e $12,6\% \pm 2,7$ para fumadores e não fumadores, respetivamente (Tabela 2 e Figura 2).

Discussão

A microcirculação cutânea é uma janela interessante para a avaliação não invasiva e em tempo real da fisiologia vascular e tem sido utilizada para obter vários marcadores quantitativos da função cardiovascular (11,21). No presente estudo, investigámos os efeitos distais do tabagismo na perfusão da pele de jovens saudáveis e activos após a HRPO. O objectivo principal é saber mais sobre o impacto do consumo regular de tabaco em jovens, especialmente quando não há evidências de qualquer compromisso clínico, para identificar resultados mensuráveis precoces que actuem como preditores de comprometimento vascular.

Sabemos que os jovens fumadores apresentam provavelmente um estado de saúde menos favorável sobretudo em termos do cálculo de risco para várias doenças cardiovasculares e respiratórias (22). A falta de ar, tosse e pieira têm sido mais associadas a jovens fumadores quando comparados com não fumadores (22,23). Relativamente à função cardíaca,

Table 2 - Laser Doppler perfusion changes expressed in arbitrary Perfusion Units (PUs) obtained during Phase I (baseline) and Phase II (challenge with cuff) and Phase III (recovery) of the experimental protocol in both groups.

Tabela 2 - Alterações perfusionais medidas com Laser Doppler expressas em Unidades de Perfusão arbitrárias (UAs) obtidas durante a Fase I (basal), Fase II (desafio com manguito) e Fase III (recuperação) do protocolo experimental em ambos os grupos.

	Total Population / População Total (n=42)	Smoker / Fumador (n=21)	Non-Smoker / Não-fumador (n=21)	p-value / Valor de p
Phase I / Fase I	139.1 ± 36.6	141.2 ± 30.8	137.0 ± 48.4	0.999
Phase II / Fase II	12.1 ± 4.3	11.1 ± 3.4	13.1 ± 7.3	0.996
Phase III (early) / Fase III (precoce)	199.3 ± 31.2	231.6 ± 40.5	167.14 ± 25.5	0.0001***
Phase III (late) / Fase III (tardia)		159.83 ± 22.1	149.6 ± 20.4	0.745

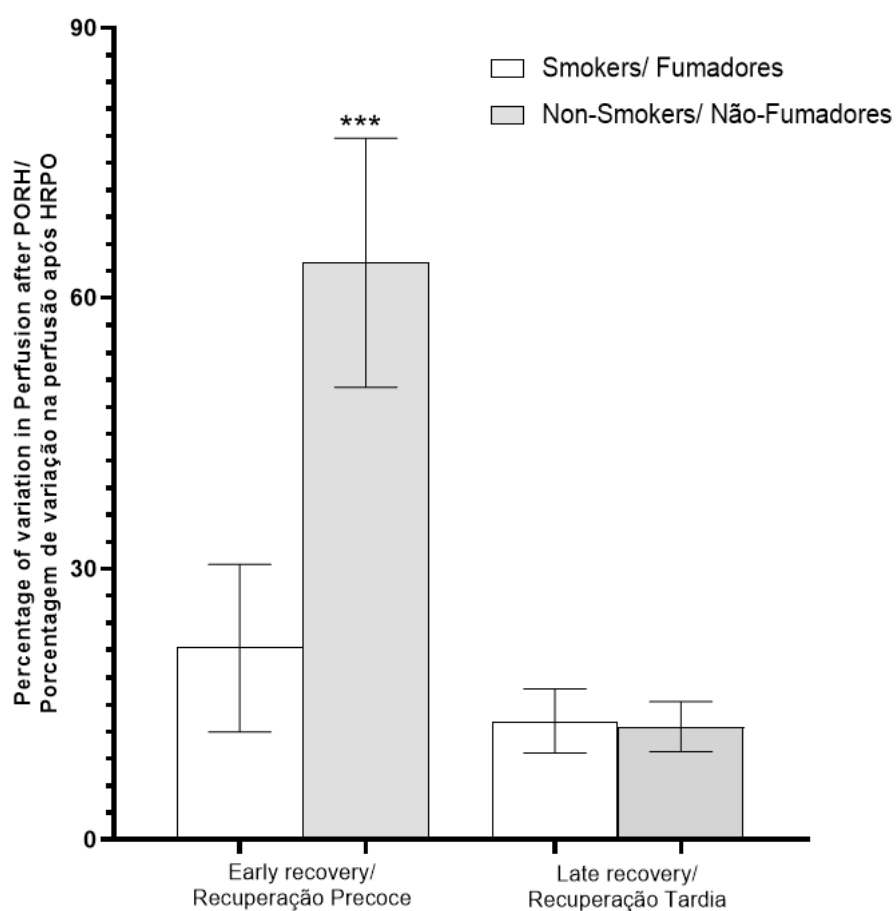


Figure 2 - Comparing perfusion responses between healthy smokers and non-smokers after Post Occlusive reactive Hyperemia during Phase III (early and late recovery periods). Data expressed as mean ± Standard Deviation (SD) (see text). (***)p<0.0001

Figura 2 - Comparação das respostas de perfusão entre fumadores saudáveis e não fumadores após hiperemia reactiva pós-oclusiva durante Fase III (períodos de recuperação precoce e tardia). Dados expressos como média ± desvio padrão (DP) (ver texto). (***)p<0.0001.

metanalysis has clearly demonstrated that smoking at early ages is strongly associated with the risk of future cardiovascular events (25,26). Significantly higher arterial stiffness was found in young smokers when compared with equivalent age non-smokers (27). It is known that products from tobacco smoking interfere with multiple processes, namely endothelial function, platelet aggregation and adhesiveness, and autonomic traffic. All of these processes and their alteration may contribute to these observed effects (28,29). Related DNA methylation changes in young adults might be associated with changes in sub-clinical markers of cardiovascular health (30).

RH and PORH are classical experimental methodologies with limited use in clinical research and practice (31). Main difficulties arise with the lack of standardization respecting the time of occlusion, measurement technologies and outcomes and site equivalence. Naturally, these factors challenge comparison of results. Additionally, and importantly, those mechanisms suggested to explain the RH response are still controversial. The activation of sensory nerves through the neural axon reflex, metabolic and myogenic components, and the production of endothelium-dependent vasodilators have been referred as part of a complex local response following RH (32). The endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) has been proposed as an important mediator (33), while the contribution of prostaglandins remains uncertain (34,35), while Nitric Oxide (NO) seems not to play a key role in this response (36,37). However, our studies clearly demonstrated that (a) the local response is only part of the reflex elicited by the PORH (15,16,38), (b) that RH is not initiated by ischemia but rather by any modification of local perfusion involving both skin plexus, whatever the origin of the stimulus involved (increase or reduction by mechanical, or neuro-humoral challenge) (15,38–40), and (c) the RH generated reflex is kept to preserve global hemodynamics (15,38,40–45). Our approach clearly characterized both groups only distinctive by the smoking habit (mild and moderate, according to the smoking index), as no other obvious physiological differences are present between both groups at rest and under occlusion. However, after PORH,

apenas alguns relatos sugerem uma ligação entre o tabagismo em idade precoce e declínio da função cardíaca (22,24). Existe uma forte evidência de relação entre tabagismo e aterosclerose (22–24) tendo sido claramente demonstrado através de metanálise que o tabagismo em idades precoces está fortemente associado ao aumento precoce do risco de futuros eventos cardiovasculares (25,26). A rigidez arterial foi considerada significativamente mais elevada em jovens fumadores quando comparados com não fumadores de idade equivalente (27). Sabemos que os produtos do tabaco interferem com múltiplos processos, nomeadamente com a função endotelial, a agregação e adesividade plaquetárias e a função autonómica. Todos estes processos e a sua alteração podem contribuir para estes efeitos observados (28,29). Mesmo nos jovens, a metilação do DNA pode estar na origem das alterações nos marcadores subclínicos de saúde cardiovascular (30).

A HR e a HRPO são metodologias experimentais clássicas mas com utilização limitada na prática clínica (31). As principais dificuldades prendem-se com a falta de normalização relativamente ao tempo de oclusão, tecnologias de medição, equivalência de locais anatómicos onde a HR é realizada e, comparação de resultados, naturalmente, difíceis de comparar nestas condições. Além disso, e igualmente importante, os mecanismos sugeridos para explicar a resposta da HR ainda não reúnem consenso. A ativação dos nervos sensoriais através do reflexo do axoneural, os componentes metabólicos e miogénicos e a produção de vasodilatadores dependentes do endotélio têm sido referidos como parte de uma resposta local complexa após a HR (32). O fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) tem sido proposto como um mediador importante (33), enquanto a contribuição das prostaglandinas permanece incerta (34,35). Por seu lado, o óxido nítrico (ON) parece não desempenhar um papel fundamental nesta resposta (36,37). No entanto, os nossos estudos demonstraram claramente que (a) a resposta local é apenas uma parte do reflexo desencadeado pela HRPO (15,16,38), (b) que a HR não é iniciada por isquemia, mas sim por qualquer modificação da perfusão local envolvendo ambos os plexos cutâneos, qualquer que seja a origem do estímulo que a provocou (aumento ou redução por desafio mecânico ou neuro-humoral) (15,38–40), e (c) o reflexo gerado pela HR é mantido para preservar a hemodinâmica global (15,38,40–45). A nossa abordagem distinguiu claramente os dois grupos apenas pelo hábito de fumar (ligeiro e moderado, de acordo com o índice de tabagismo), uma vez que não existem outras diferenças fisiológicas óbvias entre os dois grupos em repouso e

immediate recovery is significantly faster in the non-smoker group. The differences that we observed can only be attributed to tabagism, which might signify that the reflexes emerging from the RH, involving both afferent and efferent pathways and adaptive effector responses, are already dramatically different in the smoker group, even in the absence of any clinical expression and apparently involve more than just the microcirculatory unit.

The present study is exploratory and limited by several experimental constraints, such as the reduced number of participants, the absence of related hemodynamical information before and after PORH, and measurements of the contralateral limb. Nevertheless, these findings are compelling and justify further studies to better understand the early subclinical smoking impacts on healthy individuals.

Author contributions

S.F.A. performed the experimental investigation, statistical analysis, organized databases, and wrote the manuscript. L.M.R. was responsible for the concept and design of the study, writing and revising the manuscript's final version. The authors approved the final submitted version.

sob oclusão. No entanto, após a HRPO, a recuperação imediata é significativamente mais rápida no grupo de não fumadores. Estas diferenças que observámos só podem ser atribuídas ao tabagismo, o que pode significar que, mesmo na ausência de qualquer expressão clínica, os reflexos que emergem da HR, envolvendo vias aferentes e eferentes e respostas efectoras adaptativas no grupo de fumadores, já são dramaticamente diferentes. Aparentemente, envolvendo mais do que apenas a unidade microcirculatória.

O presente estudo é exploratório e limitado por várias restrições experimentais como o reduzido número de participantes, a falta de variáveis que informem sobre as variações da hemodinâmica antes e depois da HRPO, e medições do membro contralateral. No entanto, estes resultados são convincente e justificam a realização de mais estudos para compreender melhor os impactos subclínicos precoces do tabagismo em indivíduos saudáveis.

Contribuição dos autores

S.F.A. realizou a investigação experimental, a análise estatística, organizou as bases de dados e redigiu o manuscrito. L.M.R. foi responsável pela conceção e delineamento do estudo, redação e revisão da versão final do manuscrito. Os autores aprovaram a versão final submetida.

Funding

The funding for this research was provided by national funds through the Foundation for Science and Technology, I.P. (Portugal), specifically under the projects with DOIs 10.54499/UIDP/04567/2020 and 10.54499/UIDB/04567/2020, as well as by COFAC/ILIND—Cooperativa De Formação e Animação Cultural CRL/Instituto Lusófono de Investigação e Desenvolvimento through grant COFAC/ILIND/CBIOS/2/2021.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to all participants in the study.

Conflict of interest

The editors involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process. Both authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

Financiamento

O financiamento desta investigação foi assegurado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal, especificamente no âmbito dos projectos com os DOIs 10.54499/UIDP/04567/2020 e 10.54499/UIDB/04567/2020, bem como pela COFAC/ILIND-Cooperativa De Formação e Animação Cultural CRL/Instituto Lusófono de Investigação e Desenvolvimento através do subsídio COFAC/ILIND/CBIOS/2/2021.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar o seu agradecimento a todos os participantes.

Conflito de interesses

Os editores envolvidos na autoria desses manuscritos não tiveram participação no processo de revisão ou decisão. Ambos os autores declararam que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Gallucci, G., Tartarone, A., Lerose, R., Lalinga, A. V., & Capobianco, A. M. (2020). Cardiovascular risk of smoking and benefits of smoking cessation. *Journal of Thoracic Disease*, *12*(7), 3866–3876. <https://doi.org/10.21037/jtd.2020.02.47>
2. Csordas, A., & Bernhard, D. (2013). The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke. *Nature Reviews Cardiology*, *10*(4), 219–230. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.8>
3. Soleimani, F., Dobaradaran, S., De-la-Torre, G. E., Schmidt, T. C., & Saedi, R. (2022). Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Science of The Total Environment*, *813*, 152667. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152667>
4. Cha, S.-R., Jang, J., Park, S.-M., Ryu, S. M., Cho, S.-J., & Yang, S.-R. (2023). Cigarette Smoke-Induced Respiratory Response: Insights into Cellular Processes and Biomarkers. *Antioxidants*, *12*(6), 1210. <https://doi.org/10.3390/antiox12061210>
5. Ishida, M., Sakai, C., Kobayashi, Y., & Ishida, T. (2024). Cigarette Smoking and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, *31*(3), 189–200. <https://doi.org/10.5551/jat.RV22015>
6. Delgado, G. E., Krämer, B. K., Siekmeier, R., Yazdani, B., März, W., Leipe, J., & Kleber, M. E. (2020). Influence of smoking and smoking cessation on biomarkers of endothelial function and their association with mortality. *Atherosclerosis*, *292*, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.017>
7. Higashi, Y. (2023). Smoking cessation and vascular endothelial function. *Hypertension Research*, *46*(12), 2670–2678. <https://doi.org/10.1038/s41440-023-01455-z>
8. Hahad, O., Kuntic, M., Kuntic, I., Daiber, A., & Münzel, T. (2023). Tobacco smoking and vascular biology and function: Evidence from human studies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *475*(7), 797–805. <https://doi.org/10.1007/s00424-023-02805-z>
9. Philpott, A., & Anderson, T. J. (2007). Reactive Hyperemia and Cardiovascular Risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(10), 2065–2067. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.149740>
10. Paine, N. J., Hinderliter, A. L., Blumenthal, J. A., Adams, K. F., Sueta, C. A., Chang, P. P., O'Connor, C. M., & Sherwood, A. (2016). Reactive hyperemia is associated with adverse clinical outcomes in heart failure. *American Heart Journal*, *178*, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2016.05.008>
11. Roustit, M., & Cracowski, J. (2012). Non-invasive Assessment of Skin Microvascular Function in Humans: An Insight into Methods. *Microcirculation*, *19*(1), 47–64. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x>
12. Rosenberry, R., & Nelson, M. D. (2020). Reactive hyperemia: A review of methods, mechanisms, and considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *318*(3), R605–R618. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00339.2019>
13. Shirazi, B. R., Valentine, R. J., & Lang, J. A. (2021). Reproducibility and normalization of reactive hyperemia using laser speckle contrast imaging. *Plos One*, *16*(1), e0244795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244795>
14. Monteiro Rodrigues, L., Rocha, C., Gregorio, J., Florindo, M., Granja, T., & Andrade, S. (2023). Acute adaptation of skin microcirculatory perfusion does not involve local responses. *Physiology*, *38*(S1), 5789986. <https://doi.org/10.1152/physiol.2023.38.S1.5789986>
15. Faloni De Andrade, S., Granja, T., & Monteiro Rodrigues, L. (2023). Comparative view of reactive hyperemia perfusion changes in the upper-limb by laser Doppler flowmetry and optoacoustic tomography and meta-analysis: Comparação das alterações de perfusão após hiperémia reactiva no membro superior avaliadas por Fluxometria de Laser Doppler e por Tomografia Fotoacústica. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, *20*(1), 1–10. <https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.304>
16. Monteiro Rodrigues, L., Rocha, C., Ferreira, H. T., & Silva, H. N. (2020). Lower limb massage in humans increases local perfusion and impacts systemic hemodynamics. *Journal of Applied Physiology*, *128*(5), 1217–1226. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00437.2019>
17. Aboyans, V., Criqui, M. H., Abraham, P., Allison, M. A., Creager, M. A., Diehm, C., Fowkes, F. G. R., Hiatt, W. R., Jönsson, B., Lacroix, P., Marin, B., McDermott, M. M., Norgren, L., Pande, R. L., Preux, P.-M., Stoffers, H. E. (Jelle), & Treat-Jacobson, D. (2012). Measurement and Interpretation of the Ankle-Brachial Index: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*, *126*(24), 2890–2909. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e318276fbc8>
18. Leffondré, K., Abrahamowicz, M., Xiao, Y., & Siemiatycki, J. (2006). Modelling smoking history using a comprehensive smoking index: Application to lung cancer. *Statistics in Medicine*, *25*(24), 4132–4146. <https://doi.org/10.1002/sim.2680>
19. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. (2013). *JAMA*, *310*(20), 2191. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
20. DeMers, D., & Wachs, D. (2024). Physiology, Mean Arterial Pressure. In StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538226/>
21. Anyfanti, P., Angeloudi, E., Dara, A., Arvanitaki, A., Bekiari, E., Kitas, G. D., & Dimitroulas, T. (2022). Nailfold Videocapillaroscopy for the Evaluation of Peripheral Microangiopathy in Rheumatoid Arthritis. *Life*, *12*(8), 1167. <https://doi.org/10.3390/life12081167>
22. Winnall, WR, Letcher, T, Greenhalgh, EM, & Winstanley, MH. (2021). Health effects for young people who smoke. In Tobacco in Australia: Facts and issues. <https://www.tobaccoinaustralia.org.au/chapter-3-health-effects/3-21-health-effects-for-younger-smokers>
23. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. (n.d.). Preventing Tobacco Use Among Youth and Young Adults: A Report of the Surgeon General. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK99237/>
24. Batista, A. N. R., Garcia, T., Franco, E. A. T., Azevedo, P. S., Barbosa, M. F., Zornoff, L. A. M., Minicucci, M. F., De Paiva, S. A. R., Zucchi, J. W., De Godoy, I., & Tanni, S. E. (2020). Comparison of morphometry and ventricular function of healthy and smoking young people. *BMC Cardiovascular Disorders*, *20*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01372-w>
25. Georgiopoulos, G., Oikonomou, D., Pateras, K., Masi, S., Magkas, N., Delialis, D., Ajdini, E., Vlachou, V., Stamatielopoulou, K., & Charakida, M. (2021). A Bayesian meta-analysis on early tobacco exposure and vascular health: From childhood to early adulthood. *European Journal of Preventive Cardiology*, *28*(12), 1315–1322. <https://doi.org/10.1177/2047487319883557>
26. Gossios, T. D. (2021). Smoking in childhood and early adolescence: A case of the early bird not catching the worm. *European Journal of Preventive Cardiology*, *28*(14), e1–e2. <https://doi.org/10.1177/2047487319884372>
27. Binder, S., Navratil, K., & Halek, J. (2008). Chronic smoking and its effect on arterial stiffness. *Biomedical Papers*, *152*(2), 299–302. <https://doi.org/10.5507/bp.2008.047>
28. Henriksson, P., Lu, Q., Diczfalusy, U., & Freyschuss, A. (2014). Immediate Effect of Passive Smoking on Microcirculatory Flow. *Microcirculation*, *21*(7), 587–592. <https://doi.org/10.1111/micc.12137>

29. Leone, A., & Landini, L. (2013). Vascular Pathology from Smoking: Look at the Microcirculation. *Current Vascular Pharmacology*, 11(4), 524–530. <https://doi.org/10.2174/157016111311040016>
30. Sabogal, C., Su, S., Tingen, M., Kapuku, G., & Wang, X. (2020). Cigarette smoking related DNA methylation in peripheral leukocytes and cardiovascular risk in young adults. *International Journal of Cardiology*, 306, 203–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.11.103>
31. Roustit, M., Blaise, S., Millet, C., & Cracowski, J. L. (2010). Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvascular Research*, 79(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.01.001>
32. Maniewski, R. (2014). Prolonged Postocclusive Hyperemia Response in Patients with Normal-Tension Glaucoma. *Medical Science Monitor*, 20, 2607–2616. <https://doi.org/10.12659/MSM.891069>
33. Lorenzo, S., & Minson, C. T. (2007). Human cutaneous reactive hyperaemia: Role of BK Ca channels and sensory nerves. *The Journal of Physiology*, 585(1), 295–303. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143867>
34. Medow, M. S., Taneja, I., & Stewart, J. M. (2007). Cyclooxygenase and nitric oxide synthase dependence of cutaneous reactive hyperemia in humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(1), H425–H432. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01217.2006>
35. Dalle-Ave, A., Kubli, S., Golay, S., Delachaux, A., Liaudet, L., Waeber, B., & Feihl, F. (2004). Acetylcholine-Induced Vasodilation and Reactive Hyperemia Are Not Affected by Acute Cyclo-Oxygenase Inhibition in Human Skin. *Microcirculation*, 11(4), 327–336. <https://doi.org/10.1080/10739680490449268>
36. Zhao, J. L., Pergola, P. E., Roman, L. J., & Kellogg, D. L. (2004). Bioactive nitric oxide concentration does not increase during reactive hyperemia in human skin. *Journal of Applied Physiology*, 96(2), 628–632. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00639.2003>
37. Wong, B. J., Wilkins, B. W., Holowatz, L. A., & Minson, C. T. (2003). Nitric oxide synthase inhibition does not alter the reactive hyperemic response in the cutaneous circulation. *Journal of Applied Physiology*, 95(2), 504–510. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00254.2003>
38. Monteiro Rodrigues, L., Granja, T. F., & De Andrade, S. F. (2022). Optoacoustic Imaging Offers New Insights into In Vivo Human Skin Vascular Physiology. *Life*, 12(10), 1628. <https://doi.org/10.3390/life12101628>
39. Florindo, M., Gregório, J., & Monteiro Rodrigues, L. (2022). Short duration – low intensity isometric plantar flexion increases distal perfusion: Observations from a healthy cohort. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 19(1), 58–71. <https://doi.org/10.19277/bbr.19.1.286>
40. Nuno, S., Florindo, M., Silva, H., & Monteiro Rodrigues, L. (2020). Studying the impact of different body positioning, squatting, and unipodal flexion on perfusion in the lower limb – an exploratory approach complemented with optical spectroscopy (TiVi). *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 17(2), 1–10. <https://doi.org/10.19277/bbr.17.2.235>
41. Florindo, M., Nuno, S. L., & Rodrigues, L. M. (2022). Lower Limb Dynamic Activity Significantly Reduces Foot Skin Perfusion: Exploring Data with Different Optical Sensors in Age-Grouped Healthy Adults. *Skin Pharmacology and Physiology*, 35(1), 13–22. <https://doi.org/10.1159/000517906>
42. Florindo, M., Gregório, J., & Rodrigues, L. M. (2024). Lower-Limb Perfusion and Cardiovascular Physiology Are Significantly Improved in Non-Healthy Aged Adults by Regular Home-Based Physical Activities—An Exploratory Study. *Life*, 14(2), 241. <https://doi.org/10.3390/life14020241>
43. Monteiro Rodrigues, L., Rocha, C., Andrade, S., Granja, T., & Gregório, J. (2023). The acute adaptation of skin microcirculatory perfusion in vivo does not involve a local response but rather a centrally mediated adaptive reflex. *Frontiers in Physiology*, 14, 1177583. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1177583>
44. Rodrigues, L. M., Rocha, C. G., Florindo, M. E., & Gregório, J. (2021). Lower Limb Perfusion Asymmetries in Humans at Rest and Following Activity—A Collective View. *Symmetry*, 13(12), 2348. <https://doi.org/10.3390/sym13122348>
45. Rodrigues, L. M., Nuno, S. L., Granja, T., Florindo, M. E., Gregório, J., & Atalaia, T. (2022). Perfusion, Stance and Plantar Pressure Asymmetries on the Human Foot in the Absence of Disease—A Pilot Study. *Symmetry*, 14(3), 441. <https://doi.org/10.3390/sym14030441>