

Efeito da exposição à fumaça do cigarro sobre parâmetros comportamentais e peroxidação lipídica em camundongos

Effect of cigarette smoke exposition in behavioral parameters and lipid peroxidation in mice

Denise Zanatta Martini¹, Josiel Mileno Mack², Carlos Eduardo Blanco Linares³, Rodrigo Cordeiro Bolzan⁴

¹ Acadêmica de Ciências Biológicas – Universidade Regional Integrada. ² Acadêmico de Farmácia – URI. ³ Doutor em Bioquímica – URI. ⁴ Doutor em Química Analítica – UFSM/CAFW.

Resumo

O tabagismo é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de várias doenças, dentre elas o câncer. Ao inalar a fumaça de cigarro, o organismo recebe, além da nicotina, capaz de promover alterações comportamentais, elevadas quantidades de substâncias reativas de oxigênio, capazes de promover o estresse oxidativo. Este trabalho examinou as alterações comportamentais em camundongos expostos à fumaça de cigarro em um padrão de exposição que simula a exposição humana em locais fechados, como bares e boates. Também foi avaliado o índice de peroxidação lipídica no fígado, cérebro e pulmão desses animais. Os resultados obtidos permitem verificar que ocorreu alteração comportamental no grupo de camundongos exposto à fumaça do cigarro, que se tornou mais ansioso e teve elevação da atividade exploratória. Essa modificação comportamental foi acompanhada de elevação do índice de peroxidação lipídica no cérebro desses animais. Conclui-se que a exposição de camundongos a fumaça do cigarro, mesmo por curto período de tempo, é capaz de produzir alterações comportamentais e induzir a degradação do tecido cerebral através da peroxidação lipídica, tornando-se um fator de risco para o desenvolvimento de câncer e de doenças degenerativas.

Palavras-chave: cigarro, fumaça do; alterações comportamentais; estresse oxidativo; peroxidação lipídica.

Abstract

Smoking is a major risk factor for the development of various diseases, among them cancer. Inhaling cigarette smoke the organism get beyond the nicotine, which can promote behavioral changes, high levels of reactive oxygen substances capable of promoting oxidative stress. This study examined the behavioral changes in mice exposed to cigarette smoke in an exposure standard that simulates human exposure in enclosed spaces such as bars and nightclubs. It was also assessed the rate of lipid peroxidation in liver, brain and lungs of these animals. Results show that behavioral change occurred in the group of mice exposed to cigarette smoke, which became more anxious and had an increase in exploration activity. This behavioral change was accompanied by an elevated index of lipid peroxidation in the brain of these animals. In conclusion, the exposure of mice to cigarette smoke, even for a short period of time, can produce behavioral changes and induce the degradation of brain tissue through the lipid peroxidation, becoming a risk factor for development of cancer and degenerative diseases.

Keywords: Cigarette smoke- Behavioral changes- Oxidative stress -Lipid peroxidation.

INTRODUÇÃO

O tabagismo é conhecido como um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de doenças pulmonares, cardíacas e vasculares, dentre outras. Entretanto, o índice de fumantes aumenta significativamente em todo o mundo, e a previsão é de que 10 milhões de mortes ligadas ao cigarro ocorram em 70% dos países em desenvolvimento até 2020 (GIUSTI, 2007).

Durante o ato de fumar, o tabaco, além da intoxicação pelos compostos químicos previamente presentes no cigarro, são produzidas elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de

nitrogênio (ERN). As ERO e ERN são capazes de iniciar ou promover o estresse oxidativo (PANDA et al., 1999).

O estresse oxidativo (EO) é um fenômeno auto-propagativo caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e a neutralização de ERO ou ERN (OGA, 2003). O EO pode levar a alterações nas propriedades biofísicas das membranas, com perda de função, ruptura e até morte celular. Existem evidências crescentes de estudos mencionando que o dano oxidativo pelo mecanismo da peroxidação lipídica pode estar relacionado aos mecanismos etiológicos de inúmeras doenças do envelhecimento, algumas doenças neurodegenerativas e até mesmo o câncer (NONAKA-SARUKAWA et al., 2003). Em consonância com essas evidências, um estudo prévio demonstrou que o tabagismo é capaz de elevar as taxas de peroxidação lipídica *in vivo* e *in vitro* (MORROW et al., 1995).

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado associação entre tabagismo, ansiedade, depressão e

Recebido em 09 de março de 2010; revisado em 25 de outubro de 2010.
Correspondência / Correspondence: Rodrigo Cordeiro Bolzan.
Universidade Federal de Santa Maria. Colégio Agrícola de Frederico Westphalen. Linha 7 de Setembro s/n. Caixa postal 54. 98400-000 Frederico Westphalen – RS – Brasil. Tel: (55) 3744-8984 E-mail: robolzan@smail.ufsm.br

alterações de humor. Himle, Thyer e Fischer (1988), em um estudo com pacientes com transtornos de ansiedade, como agorafobia e transtorno de pânico, encontraram elevada prevalência de tabagismo, enquanto Breslau e Klein (1999), ao estudarem uma amostra de adultos jovens em Detroit, EUA, verificaram que, em dependentes de nicotina, houve elevados índices de depressão e transtorno de ansiedade.

Assim, este estudo buscou avaliar os efeitos da inalação da fumaça de cigarro sobre o comportamento e sobre a geração de produtos da peroxidação lipídica em camundongos expostos de forma passiva à fumaça do cigarro. Para tanto, foi utilizado um modelo de exposição que simula a exposição humana de forma passiva em ambientes fechados, como bares e boates.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 20 camundongos linhagem *Wistar*, albinos machos, provenientes do biotério da URI, divididos em grupo-controle (não exposto à fumaça de cigarro) e grupo-teste (exposto à fumaça de cigarro). Os animais possuíam aproximadamente sessenta dias de vida e pesavam entre 25 e 35 gramas. Foram mantidos em caixas de polietileno individuais, sob temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro–escuro de 12 horas e água e alimento *ad libitum*.

O equipamento utilizado para a exposição dos camundongos à fumaça de cigarro de forma passiva foi uma câmara composta de uma caixa de vidro nas dimensões de 20x20x20 cm (Figura 1), com uma pequena abertura em um dos vértices onde foram acopladas as tubulações para insuflar ar e fumaça de cigarro. Essas tubulações foram conectadas a um equipamento que fornece pressão positiva para o interior da câmara de exposição. Para insuflar fumaça de cigarro no interior da câmara, a tubulação dedicada a essa função foi adaptada para acoplar o cigarro e, conseqüentemente, formar a fumaça, insuflando-a para o interior da câmara de exposição. A segunda entrada de ar não foi alterada e, portanto, insuflou ar atmosférico para o interior da câmara.

O grupo-teste foi mantido no interior da câmara de exposição em ambiente preenchido por fumaça produzida por cigarro com 0,9 mg de nicotina e 10 mg

de alcatrão por unidade, por tempo total de 4 horas, com ciclos de exposição–não exposição de 15 minutos cada. Já o grupo-controle foi mantido na câmara de exposição, na ausência de fumaça de cigarro no ambiente. O tempo de exposição utilizado simula a exposição humana à fumaça do cigarro (fumante passivo) em ambientes fechados, como boates e bares. O equipamento utilizado foi baseado no trabalho descrito por Silva, Santos e Botelho (1996).

Os camundongos foram pesados antes e após a exposição à fumaça para verificar o seu efeito sobre o peso dos camundongos, sendo que, após a exposição, os dois grupos foram avaliados no teste do campo aberto e, em seguida, no labirinto em cruz elevado (LCE), para análise comportamental.

Imediatamente após a análise comportamental, os camundongos foram sacrificados, seus órgãos internos dissecados – o fígado, o cérebro e o pulmão – para investigação da presença de produtos de peroxidação lipídica. Para análise de peroxidação lipídica, foi medido o teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) nesses órgãos.

Este estudo teve seu protocolo de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus Frederico Westphalen, registrado sob o número 040-08A.

O teste do campo aberto – *open-field*

O teste do campo aberto consiste de uma superfície grande e vazia, onde existem linhas dispostas, na qual a cobaia é colocada tanto no centro quanto próximo da parede e avaliada pelo seu comportamento. Nesse teste, verifica-se o número de vezes que as linhas são cruzadas pela cobaia, o número de vezes que se apoia nas patas posteriores observando (*rearing*) e realiza autolimpieza (*grooming*), além da quantidade de bolos fecais produzidos. Esses parâmetros indicam possíveis alterações comportamentais (BRITO, 1994).

O campo aberto utilizado possui 60 cm de comprimento, 40 cm de largura e bordas com 15 cm de altura, sendo de 10 cm a distância entre as linhas dispostas na superfície de movimentação.

O teste campo aberto foi realizado 60 minutos após o final da exposição, tendo a duração de 100 minutos, dos quais os primeiros 30 minutos foram usados somente para adaptação dos camundongos ao meio para posterior avaliação comportamental.

A avaliação comportamental foi realizada em 3 períodos, divididos da seguinte forma:

1° período: dos 30 aos 40 minutos de presença no campo aberto;

2° período: dos 60 aos 70 minutos de presença no campo aberto;

3° período: dos 90 aos 100 minutos de presença no campo aberto;

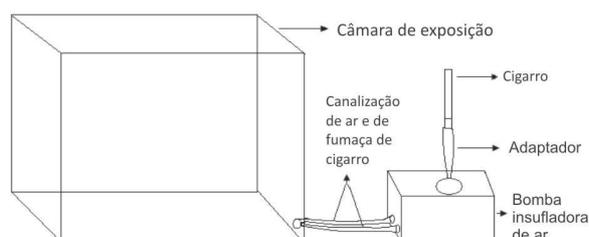


Figura 1- Equipamento utilizado para expor os camundongos à fumaça do cigarro de forma passiva.

Nos 3 períodos, avaliaram-se os parâmetros: número de linhas cruzadas, número de *rearing*, número de *grooming* e quantidade de bolos fecais produzidos.

O teste do labirinto em cruz elevado – *plus-maze*

O LCE tem sido utilizado para elucidar a relação entre ansiedade, emocionalidade e estresse através de medidas comportamentais. O desempenho nesse teste baseia-se na criação de um conflito entre o desejo natural de exploração e o medo de áreas abertas ou expostas, caracterizado por manifestações comportamentais e fisiológicas (HOLSBOER et al., 1998).

O LCE foi realizado após o teste do campo aberto, totalizando 3 horas após o final da exposição à fumaça do cigarro. O LCE utilizado nesse teste é uma estrutura de dois braços abertos e opostos com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada um e outros dois braços opostos, do mesmo tamanho, fechados com paredes laterais de 15 cm de altura.

Após período de adaptação do camundongo ao labirinto, foi lhe-permitido circular livre nele. O camundongo teve seu comportamento avaliado por 10 minutos.

Avaliação da peroxidação lipídica: determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em fígado, cérebro e pulmão

Decorridas 24 horas do fim da exposição, os animais foram sacrificados por decapitação, retirando-se fígado, cérebro e pulmão para análise. Esses órgãos foram armazenados em banho de gelo. Após pesagem, foi determinado o teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nessas amostras.

A determinação foi realizada de acordo com o método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990), que se baseia no fato de que alguns produtos da peroxidação lipídica, como os aldeídos, são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Dessa forma, quando se adiciona TBA a uma amostra de material biológico, é possível detectar a presença dessas substâncias conhecidas como TBARS. Apesar de um grande número de substâncias apresentarem esse tipo de reatividade, o malondialdeído (MDA) é a principal delas, sendo um dos produtos finais do processo de oxidação e decomposição de ácidos graxos poli-insaturados. O MDA tem sido amplamente utilizado como marcador para estresse oxidativo.

Para determinação do teor de TBARS, os órgãos foram homogeneizados em solução salina e centrifugados por 10 minutos a 2000 RPM. Utilizou-se o sobrenadante para a realização do ensaio analítico. A amostra de sobrenadante foi incubada em banho termoestabilizado a 95 °C por 60 minutos, em pH = 3,5 (tampão acetato de sódio 5,8% (m/v)), na presença de dodecilsulfato de sódio 0,31% (m/v) e ácido tiobarbitúrico 0,23% (m/v). Após incubação, foram realizadas as leituras das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC) em 532nm.

Análise estatística

Os dados foram analisados através do teste *t* de Student. Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas com o auxílio do Software GRAPH PAD INSTAT (1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após exposição dos camundongos à fumaça de cigarro por 4 horas, com ciclo de exposição–não exposição de 15 minutos, foi realizada análise comportamental através dos testes do campo aberto e do LCE. Finalizados os testes comportamentais, os camundongos foram sacrificados para pesagem dos órgãos isolados e determinação de TBARS.

Não houve diferença significativa no peso total e na relação peso do órgão (fígado, cérebro ou pulmão)/peso total entre os grupos de camundongos expostos e não-expostos à fumaça de cigarro nas condições testadas neste trabalho.

Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre o comportamento de camundongos no campo aberto

Após exposição à fumaça de cigarro, esperou-se durante 60 minutos para iniciar a realização do teste do campo aberto. No referido teste, foram observados: o número de linhas cruzadas, de *rearing*, de *grooming* e o número de bolos fecais produzidos (Figura 2) em três períodos de tempo distintos: Período 1 (entre o 30º e o 40º minutos no campo aberto), Período 2 (entre o 60º e o 70º minutos no campo aberto) e Período 3 (entre o 90º e o 100º minutos no campo aberto).

Os camundongos expostos à fumaça de cigarro apresentaram ligeira diminuição dos parâmetros número de “linhas cruzadas”, “*rearing*” e “*grooming*” (Figura 2 A, B e C) no Período 2 de observação, em relação ao registrado no Período 1; entretanto, os valores foram estatisticamente iguais aos registrados para o grupo não-exposto no mesmo período de observação. No Período 3 de observação, o número de linhas cruzadas, de “*rearing*” e de “*grooming*” diminuiu de forma linear, acompanhando a diminuição observada nos períodos de tempo de observação anteriores apenas nos camundongos não-expostos à fumaça de cigarro. Nos camundongos expostos à fumaça de cigarro, esses parâmetros se mantiveram ou elevaram-se numericamente em relação ao “Período 2”, sendo estatisticamente diferentes dos valores registrados para o grupo não-exposto no mesmo período de observação. A inquietação inicial dos camundongos de ambos os grupos, nesses parâmetros de observação, pode ter ocorrido devido à necessidade de o animal percorrer todo ambiente em que foi inserido para um diagnóstico, o que poderá possibilitar diminuição do medo inicial (CANDLAND; NAGY, 1969). No grupo de camundongos não-exposto à fumaça de cigarro, a diminuição da inquietação foi francamente observada,

devido à diminuição linear do número de linhas cruzadas, de *rearing* e de *grooming* através do tempo, enquanto que, com os camundongos expostos à fumaça do cigarro, esse fato não ocorreu. Nos camundongos expostos à fumaça do cigarro, a inquietação foi maior no Período 3 de observação no campo aberto, denotando possível efeito da fumaça do cigarro, em particular dos componentes dessa fumaça. Entre esses componentes, pode-se destacar a nicotina, que, quando em pequenas quantidades, ocasiona a liberação de adrenalina, aumentando o estado de alerta, a hiperatividade e a ansiedade, sendo que essa última se assemelha ao medo, diferenciando-se por não ter uma ameaça definida (OGA, 2003). O medo e a curiosidade são apontados como fatores motivacionais eliciadores da atividade exploratória (CANDLAND; NAGY, 1969).

Os camundongos expostos à fumaça do cigarro produziram quantidades significativamente maiores de bolos fecais nos Períodos 2 e 3 de observação, em relação aos camundongos não-expostos nos mesmos períodos de observação. O número de bolos fecais formado possui relação com a questão comportamental, pois, uma vez em situações novas ou ambiente desconhecido do seu natural, ocorre medo e (ou) ansiedade, o que ocasiona defecação como resposta relacionada a esse sentimento (DENENBERG, 1969). Assim, pode-se inferir que os camundongos expostos à fumaça do cigarro permanecem em estado de alerta, hiperativos ou ansiosos por tempo maior que os camundongos não-expostos. Após ser inalada, a nicotina chega através da corrente sanguínea até o cérebro, agindo no sistema nervoso autônomo (SNA), especificamente no sistema parassimpático, aumentando o tônus e a atividade motora do intestino. Como o SNA atua sobre a musculatura lisa do sistema gastrointestinal, levando à contração e ao relaxamento dessa musculatura, a presença da nicotina provoca alterações nervosas que aumentam a atividade do sistema intestinal, podendo ocasionar maior defecação até mesmo em forma de diarreia (DALE; RANG; RITTER, 1997). Assim, pode-se inferir que a elevada quantidade de bolos fecais produzida pelos camundongos expostos à fumaça do cigarro pode estar relacionada com a existência de medo, de ansiedade ou de estresse, além da ação farmacológica da nicotina no sistema nervoso central.

Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre o comportamento dos camundongos no LCE

Após a exposição dos camundongos à fumaça de cigarro e sua avaliação comportamental em campo aberto, os referidos camundongos foram avaliados no LCE.

No LCE, não houve diferença significativa entre o comportamento dos camundongos expostos e dos não-expostos à fumaça de cigarro (Figura 3). Pode-se argumentar que, devido ao fato de o teste no LCE ter

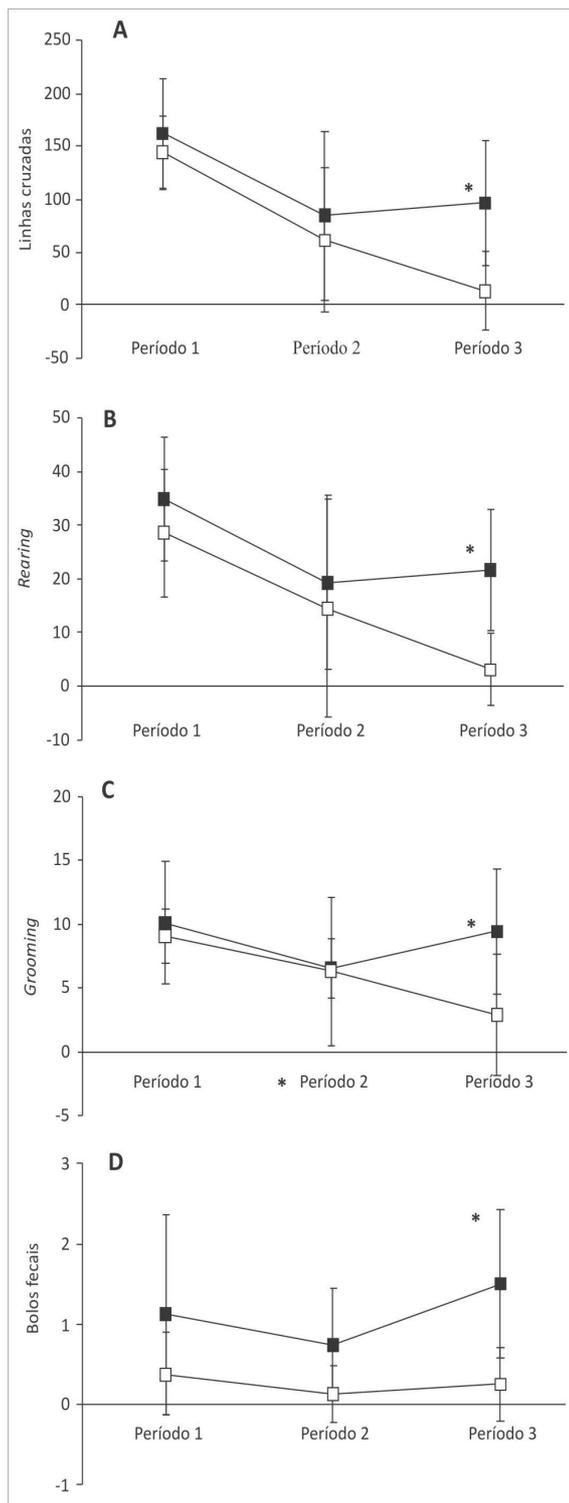


Figura 2- Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre o comportamento dos camundongos no campo aberto. Notas: A – número de linhas cruzadas; B – *rearing* (número de observações nas patas posteriores); C – *grooming* (número de vezes em que realizou autolimpeza); D – número de bolos fecais produzidos; □ – Grupo controle (não exposto à fumaça de cigarro); ■ – Grupo teste (exposto à fumaça de cigarro); Período 1 = observação realizada entre o 30º e o 40º minuto; Período 2 = observação realizada entre o 60º e o 70º minuto; Período 3 = observação realizada entre o 90º e o 100º minuto; * = estatisticamente diferente do controle, $p < 0,05$.

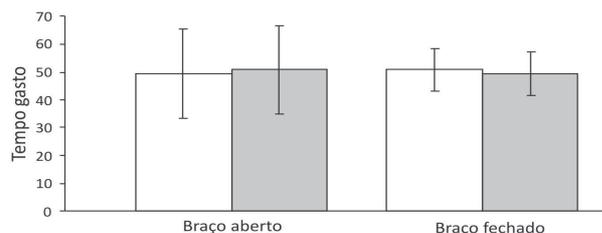


Figura 3- Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre o comportamento dos camundongos no LCE.

Nota: □ – Grupo-controle (não-exposto à fumaça de cigarro); ■ – Grupo teste (exposto à fumaça de cigarro).

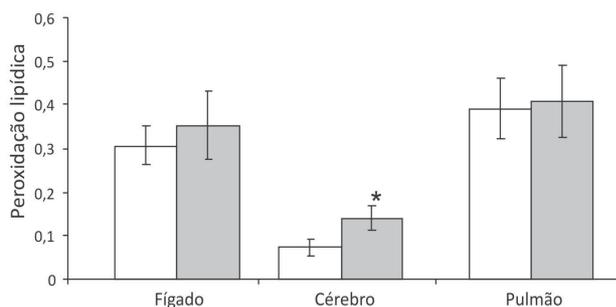


Figura 4 - Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em fígado, cérebro e pulmão de camundongos.

Notas: □ – Grupo-controle (não-exposto à fumaça de cigarro); ■ – Grupo-teste (exposto à fumaça de cigarro); * = estatisticamente diferente do controle, $p < 0,05$.

sido realizado 3 horas após o final da exposição à fumaça do cigarro, o grupo exposto à fumaça de cigarro já não estava mais sob efeito da nicotina, visto que seu tempo de meia-vida ser de cerca de 60 a 120 minutos. Após esse tempo, a nicotina é eliminada na forma de cotinina e outros metabólitos, depois de biotransformada no fígado (DALE; RANG; RITTER, 1997).

Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em fígado, cérebro e pulmão de camundongos.

Após a realização dos testes comportamentais, os camundongos foram sacrificados e foi determinado o índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado, cérebro e pulmão desses animais.

Os resultados mostram que a quantidade de TBARS no fígado e pulmão dos camundongos do grupo exposto à fumaça de cigarro não foi estatisticamente diferente do valor encontrado para o grupo não-exposto. Já quando analisados os resultados encontrados para esse índice no cérebro, verifica-se que o índice TBARS encontra-se elevado no grupo exposto à fumaça do cigarro, demonstrando possível degradação do tecido cerebral devido à exposição à fumaça de cigarro (peroxidação lipídica) (Figura 4). Em consonância com esse dado, um trabalho prévio encontrou elevação do índice TBARS e diminuição das defesas antioxidantes

em pulmão de filhotes de ratos expostos à fumaça de cigarro (LUCHESE et al., 2007). Entretanto, no referido trabalho o tempo total de exposição dos camundongos à fumaça de cigarro foi de 3 semanas, ou seja, bem mais longo do que o utilizado neste trabalho.

No presente trabalho, a fonte de RL exógena (fumaça de cigarro) levou a um aumento do parâmetro que indica a degradação do tecido cerebral. Assim, devido ao aumento do número de agentes oxidantes, eleva-se a probabilidade de ocorrência de lesões oxidativas em estruturas celulares que prejudicam o funcionamento do organismo, especificamente o cérebro, o que pode levar à morte celular, sendo a peroxidação lipídica descontrolada a maior fonte de produtos citotóxicos (LITTLE; GLADEN, 1999).

Zalata e colaboradores (2007) relatam que crianças expostas à fumaça de cigarro apresentam elevação do número de oxidantes e diminuição da quantidade de antioxidantes plasmáticos, o que pode levar a danos no DNA, demonstrando, assim, a relação entre a inalação de fumaça de cigarro e a ocorrência de estresse oxidativo.

O cérebro é muito dependente de energia para o seu funcionamento, sendo que a mitocôndria é a estrutura responsável pela produção dessa energia na forma de ATP, possuindo uma alta demanda por oxigênio. Isso torna o cérebro altamente susceptível à ação de ERO. Além desse fator, também contribui para essa susceptibilidade o alto conteúdo de ferro, seu alto conteúdo lipídico em relação aos outros tecidos, (principalmente lipídios de cadeia lateral poliinsaturada) e a sua baixa defesa antioxidante (HALLIWELL, 1996). Pode ocorrer ainda uma disfunção mitocondrial por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória, com conseqüente prejuízo no transporte de elétrons, o que leva a uma dispersão dos elétrons na forma de RL potencialmente danosos à célula.

Várias são as evidências que sugerem que os RL e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese dos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e as disfunções mitocondriais formem um ciclo vicioso na doença de Parkinson (SCHAPIRA et al., 1990). Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel-chave na morte neuronal (MARKESBERY; CARNEY, 1999). Assim, é possível que a exposição à fumaça de cigarro seja um fator de risco para o desenvolvimento dessas doenças, uma vez que o cérebro, de acordo com o estudo aqui apresentado, parece ser o órgão mais afetado pela degradação através da peroxidação lipídica.

CONCLUSÃO

Este estudo apresenta relação positiva entre a exposição de camundongos à fumaça de cigarro (em

padrão de exposição compatível com a exposição humana por curto período em locais fechados como bares e boates) e a ocorrência de modificações comportamentais e no índice de peroxidação lipídica nos órgãos desses animais.

As alterações comportamentais foram observadas em campo aberto, 60 minutos após a exposição dos animais à fumaça de cigarro, e permitiram verificar que houve elevação nos índices de ansiedade, medo e atividade exploratória dos camundongos expostos à fumaça do cigarro em relação aos camundongos não-expostos.

Essa modificação comportamental foi acompanhada ainda de elevação na geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no cérebro dos animais expostos à fumaça do cigarro, apresentando o cérebro com alvo potencial ao ataque pelos radicais livres, elevando a suscetibilidade do organismo às doenças oriundas de seu mau funcionamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem a URI pelo suporte a este trabalho.

REFERÊNCIAS

- BRESLAU, N.; KLEIN, D.F. Smoking and panic attacks: an epidemiologic investigation. *Arch. Gen. Psychiatry*, Chicago, v.56, p.1141-1148, 1999.
- BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas:Ed. UNICAMP, 1994.
- CANDLAND, D.K.; NAGY, Z.M. The open field: some comparative data. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, New York, v.159, p.831-851, 1969.
- DALE, M.M.; RANG, H.P.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- DENENBERG, V.H. Open field behaviour in the rat: what does it mean? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v.159, p.852-859, 1969.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.*, New York, v.186, p.407-428, 1990.
- GIUSTI, A.L. Interferência do tabaco no sistema imunitário: estado atual e perspectivas: revisão da literatura. **ConScientiae Saúde**, São Paulo, v.6, p.155-163, 2007.
- HALLIWELL, B. Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.*, London, v.24, p.1023-1027, 1996.
- HIMLE, J.; THYER, B.A.; FISCHER, D.J. Prevalence of smoking among anxious outpatients. **Phob. Pract. Res. J.**, New York, v.1, p.25-31, 1988.
- HOLSBOER, F. et al. Behavioral profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behav. Brain. Res.**, Amsterdam, v.94, p.2301-2310, 1998.
- LITTLE, R.E.; GLADEN, B.C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. **Reprod. Toxicol.**, Elmsford, v.13, p.347-399, 1999.
- LUCHESE, C. et al. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. **Toxicology**, Limerick, v.230, p.189-196, 2007.
- MARKESBERY, W.R.; CARNEY, J.M. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. **Brain Pathol.**, Zurich, v.9, p.133-146, 1999.
- MORROW, J.D. et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-Isoprostanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.332, p.1198-1203, 1995.
- NONAKA-SARUKAWA, M. et al. Increased urinary 15-F2t-isoprostane concentrations in patients with non-schaemic congestive heart failure: a marker of oxidative stress. **Heart**, London, v.89, p.871-875, 2003.
- OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2003.
- PANDA, K. et al. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v.27, p.1064-1079, 1999.
- SCHAPIRA, A.H. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, New York, v.54, p.823-827, 1990.
- SILVA, R.M.V.G.; SANTOS, M.G.L.; BOTELHO, C. Influência do tabagismo no ganho ponderal, crescimento corporal, consumo alimentar e hídrico de ratos. **J Pneumol.**, São Paulo, v.23, p.124-130, 1996.
- ZALATA, A. et al. Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.629, p.140-147, 2007.