



Efeito da nicotina sobre fagócitos ativados

Andreza Urba de Quadros, Loriangela Marceli Dalposso, Thaysa Ksiaskiewicz Karam, Rubiana Mara Mainardes e Najeh Maissar Khalil*

Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 3, 85040-080, Guarapuava, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: najeh@unicentro.br

RESUMO. Indivíduos fumantes apresentam aumento na proporção de leucócitos polimorfonucleares (LPMN), como por exemplo, no tecido pulmonar, resultando em aumento nos níveis de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio, que ocasionam efeito destrutivo na matriz celular e contribuem para a progressão da doença pulmonar, além de favorecer o aparecimento de infecções microbianas, e determinam que as células fagocíticas estejam em frequente estado de ativação (fagocitose). Neste trabalho, avaliou-se a influência da nicotina (NIC) sobre a viabilidade de LPMN e macrófagos ativados ou não, pelos estímulos zymosan e acetato de forbol miristato. Os resultados indicaram que a NIC promove aumento na viabilidade de LPMN e macrófagos ativados em relação a essas células ativadas sem a presença de NIC, avaliada 'ex vivo' pelo teste de exclusão do azul de trypan. Esse efeito foi significativamente mais pronunciado sobre LPMN que sobre os macrófagos. Essa redução na citotoxicidade favorece a sobrevivência da célula, podendo exacerbar os seus efeitos deletérios, especialmente em no seu estado ativado, pela maior produção de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: viabilidade, zymosan, acetato de forbol miristato, espécies reativas de oxigênio.

Effect of the nicotine on activated phagocytes

ABSTRACT. Smokers show increased rates of polymorphonuclear leukocytes (PMNL), including in pulmonary tissue, resulting increased levels of proteolytic enzymes and reactive oxygen species, which have a destructive effect on the cellular matrix and contribute to the progression of pulmonary disease, in addition to promoting the onset of microbial infections which cause phagocytic cells to be in a state of frequent activation (phagocytosis). This work evaluated the influence of nicotine (NIC) on the viability of PMNL and macrophages (activated or not), by stimuli zymosan and phorbol myristate acetate. The results indicated that NIC led to increased viability of PMNL and activated macrophages compared to these cells activated without NIC, measured *ex vivo* by trypan blue exclusion test. This effect was significantly higher on PMNL than on macrophages. This reduction in cytotoxicity favors cell survival, and may exacerbate its deleterious effect, especially in the active state, due to increased production of reactive oxygen species.

Keywords: viability, zymosan, phorbol myristate acetate, reactive oxygen species.

Introdução

A nicotina (NIC); ([3-(1-metil-2-pirrolidinil) piridina]; é uma amina terciária composta pelos anéis piridina e pirrolidina e representa o principal componente farmacológico do tabaco. A atividade farmacológica da NIC deve-se principalmente à sua interação com receptores colinérgicos do tipo nicotínicos, resultando na liberação de catecolaminas vasoativas e peptídeos neuroativos que medeiam sensibilidade e a tolerância para este composto (BENOWITZ, 2010). Seu metabolismo é hepático e ocorre em duas etapas (NAKAJIMA et al., 2006): i) mediada pelo sistema citocromo P₄₅₀ formando o íon nicotina- $\Delta^{1(5)}$ iminium e ii) mediada pela aldeído oxidase, sendo formada a cotinina, sendo esta última, quantitativamente o metabólito mais importante da NIC.

Grande parte dos estudos que envolvem NIC se relaciona com seus efeitos sobre o sistema nervoso central e periférico, pouco se conhecendo sobre seus efeitos em outros tecidos, células individuais e sistemas enzimáticos.

Em fagócitos, há presença de receptores não-colinérgicos específicos para a NIC, principalmente em leucócitos polimorfonucleares (LPMN) (DAVIES et al., 1982), sendo sugerido que alguns dos efeitos adversos do fumo do cigarro, observados nas funções dos LPMN, podem estar relacionados a esses receptores, especialmente pelo fato de que fumantes têm maior expressão desses receptores. A NIC exerce efeito citotóxico sobre LPMN não-ativados, em concentrações próximas aquelas encontradas na cavidade oral e no fluido broncoalveolar de fumantes.

A NIC potencializa a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em neutrófilos, induzido por acetato de forbol miristato (PMA), sendo que esse efeito não foi inibido na presença de antagonistas de receptores nicotínicos, corroborando com outros dados na existência da ação não-colinérgica (GILLESPIE et al., 1987; WETSCHER et al., 1995).

Em contrapartida aos estudos anteriores, foi observado que a NIC exerce *in vitro* alterações no metabolismo oxidativo de macrófagos alveolares de cobaias (OGUNBIYI; MISRA, 1989), com redução dose-dependente da quimiluminescência dependente do luminol e da produção do $O_2^{\cdot-}$, quando estes foram estimulados por zymosan opsonizado ou PMA. Além disso, foi demonstrado o efeito adverso da NIC na respiração (consumo de O_2) e no sistema ATPase de macrófagos alveolares, com ação bifásica: estimulante em baixas concentrações e inibitório em altas concentrações (MEYER et al., 1971). Esses estudos demonstram que ainda existem contradições sobre o potencial efeito da NIC nos sistemas relacionados ao metabolismo oxidativo de fagócitos, demonstrando a necessidade de mais estudos para melhor observação nesses modelos.

Também, poucos trabalhos avaliaram o efeito da NIC sobre fagócitos ativados, onde ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas proteolíticas. O objetivo deste estudo é verificar o efeito da NIC sobre LPMN e macrófagos quiescentes ou estimulados por zymosan ou PMA, pela medida da viabilidade dessas células reveladas pelo teste de exclusão do azul de trypan.

Material e métodos

Reagentes

O tartarato de nicotina, zymosan, PMA e o glicogênio de ostra foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os demais reagentes são de grau analítico.

Tampão PBS-Dulbecco (PBS-D)

Composição ($g L^{-1}$): NaCl 8,0 $g L^{-1}$, KCl 0,2 $g L^{-1}$, Na_2HPO_4 1,15 $g L^{-1}$, KH_2PO_4 0,2 $g L^{-1}$, $CaCl_2$ 0,1 $g L^{-1}$ e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,1 $g L^{-1}$.

Preparo do Zymosan 10 mg mL^{-1}

Para a preparação do Zymosan, 100 mg do mesmo foram adicionados em 10 mL de água ultrapura, ferveu-se por 10 min., aproximadamente, até ficar com consistência pastosa, centrifugou-se a 200 x g por 5 min. e lavou-se uma vez com PBS-D sem Ca^{++} . Ressuspendeu-se em 10 mL de PBS-D, os quais foram divididos em alíquotas de 1 mL e conservados a $-20^\circ C$.

Acetato de forbol miristato-PMA ($1 \times 10^{-5} M$)

Dissolveram-se 5 mg de PMA em 8 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo-se uma solução a $1 \times 10^{-3} M$. A partir dessa solução diluiu-se em DMSO para a concentração $1 \times 10^{-5} M$, sendo essas soluções divididas e estocadas $-20^\circ C$ em dessecador sob vácuo. Na hora do uso, diluiu-se com PBS-D para concentração $1 \times 10^{-6} M$.

Solução Azul de Trypan 0,5%

A solução de azul de Trypan 0,5% foi preparada em solução de NaCl 0,85%.

Obtenção dos fagócitos de exsudato peritoneal de ratos (*Rattus albinus norvegicus*)

Em cada animal (machos, entre 100-160 g), foram injetados intraperitonealmente 10 mL de solução de glicogênio de ostra a 0,5% em NaCl a 0,85%. Após 12h (para a obtenção de neutrófilos) ou 72h (para a obtenção de macrófagos) o animal foi sacrificado e a cavidade abdominal foi lavada injetando-se 5 mL de tampão PBS-D, contendo 10 UI de heparina mL^{-1} ; o lavado peritoneal foi colhido em tampão PBS-D sem cálcio, por meio de sucção com seringa e agulha. Após, transferido para um tubo cônico siliconizado e centrifugado a 200 x g, por 3 min. As células sedimentadas foram lavadas duas vezes com PBS-D sem cálcio. Após, as células foram centrifugadas por 5 min. a 1.000 x g. As células foram novamente lavadas em PBS-D sem cálcio e contadas em câmara de Neubauer. Durante os experimentos, essas células permaneceram em banho de gelo. Os procedimentos experimentais foram aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa Animal.

Avaliação da citotoxicidade

Para essa avaliação, utilizou-se o método do corante azul de trypan. O princípio desse teste é a não-incorporação do corante pelas células viáveis. Os ensaios foram realizados em tampão PBS-D a $37^\circ C$, volume final de 0,1 mL. As células (LPMN ou macrófagos; 1×10^6 $0,1 mL^{-1}$) foram incubadas na ausência ou presença de diferentes concentrações de NIC e de estímulo (PMA ou zymosan) por 30 min. Após, foram adicionados 0,1 mL do azul de trypan, e após 5 min., as células (viáveis ou não) foram contadas em câmara de Neubauer (200 células).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. A interpretação dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), sendo 0,05 o nível de significância.

Resultados e discussão

Foram realizados ensaios de citotoxicidade sobre LPMN e macrófagos obtidos por exsudato peritoneal de ratos, pelo método da exclusão pelo azul de trypan. Esses ensaios foram realizados na ausência ou presença de diferentes concentrações de NIC e também de zymosan ou PMA (esses últimos estimuladores do surto oxidativo de fagócitos). O zymosan é um antígeno que ativa a célula exercendo o processo de fagocitose, e o PMA é um antígeno solúvel, ativando a cascata de reações do fagócito diretamente no citossol.

Pode-se observar pelas Tabelas 1, 2, 3 e 4 que a NIC na presença das células exerce efeito citotóxico, em comparação com o controle (5% para LPMN e 6% para os macrófagos), sobre LPMN e macrófagos. Mas, esse efeito é sempre inferior quando comparado com o sistema células e estímulo (zymosan: 76% sobre os macrófagos e 17% sobre os LPMN ou PMA: 17% sobre os LPMN e macrófagos). No sistema com a presença dos LPMN + estímulo + NIC, é perceptível a ampla diminuição da citotoxicidade (LPMN + zymosan + NIC: de 6 a 15% e LPMN + PMA + NIC: de 2 a 5% dependendo da concentração de NIC) comparando com os outros sistemas (LPMN + estímulo e LPMN + nicotina). Já em relação aos macrófagos também é evidenciado um efeito citoprotetor da NIC sobre o sistema macrófagos + estímulo (LPMN + macrófagos + NIC: de 5 a 8% e macrófagos + PMA + NIC: de 7 a 12% dependendo da concentração de NIC) embora esse efeito seja bem menos pronunciado (em termos de % de células não-viáveis) quando comparado com os LPMN.

De acordo com os resultados, a NIC promove aumento na viabilidade de LPMN e macrófagos estimulados, podendo favorecer a exacerbação dos efeitos deletérios dessas células, especialmente quando ativadas, pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e/ou enzimas proteolíticas. Outros autores citam que a NIC promove aumento da sobrevivência de LPMN por supressão da sua apoptose e por ser um fator de quimiotaxia dessas células nos pulmões (AOSHIBA et al., 1996).

Indivíduos fumantes apresentam neutrofilia (TERASHIMA et al., 1999), aterosclerose (KOUGIAS et al., 2005) e periodontite (PALMER et al., 2005), entre outras causas, por influxo e degranulação de LPMN. Em indivíduos fumantes há aumento na proporção de LPMN no tecido pulmonar, podendo haver aumento nos níveis de enzimas proteolíticas e espécies oxidantes, ocasionando efeito destrutivo na matriz celular (DOMAGALA-KULAWIK, 2008) e influenciando na progressão da doença pulmonar (REPINE et al.,

1997), além de que o cigarro favorece o aparecimento de infecções microbianas, que determinam que as células fagocíticas estejam em frequente estado de ativação. Biopsias de pulmões realizadas de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) demonstraram um aumento de LPMN nas vias aéreas, mecanismo esse que pode envolver desde a deformabilidade dessas células como o aumento de interleucinas (KEATINGS et al., 1996). Oxidantes com o $O_2^{\cdot-}$ estão relacionados com o desenvolvimento da DPOC, e a sua produção nos pulmões é devida especialmente aos LPMN. Um dos principais fatores para o desenvolvimento de doenças agudas do pulmão é a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, fatores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas, todos relacionados à presença de LPMN e macrófagos, especialmente ativados (CHOW et al., 2003). Nesses contextos, a NIC pode favorecer ainda mais a presença de células fagocíticas no tecido pulmonar.

O possível mecanismo envolvido na diferença entre LPMN e macrófagos é a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A MPO representa mais de 5% do conteúdo proteico total da célula em neutrófilos e 1% nos monócitos macrófagos⁻¹ (HANSSON et al., 2006). Essa enzima é a responsável pela formação de HOCl, um potente oxidante gerado no surto oxidativo, que é responsável tanto pela morte de microorganismos como também da própria célula. O HOCl pode causar diversos efeitos deletérios as células e biomoléculas, como halogenação do DNA, entre outros (KAWAI et al., 2004; MALLE et al., 2007). Os LPMN possuem quantidades bem superiores de MPO em relação aos macrófagos. Estudos mostram que a NIC possui interação com o HOCl, modelos químicos e enzimáticos, levando a formação do íon cloramônio, podendo ampliar o dano causado pelo HOCl (MASUDA et al., 2001; SUZUKI; OHSHIMA, 2002). Por outro lado, a cotinina, o principal metabólito da NIC, não possui efeito sobre espécies reativas de oxigênio (como o HOCl) (VELLOSA et al., 2007). Esses estudos baseiam-se, na sua maioria, em ensaios *in vitro* ou enzimáticos, condição diferente do sistema celular completo, no qual o sistema fagocítico ativo interage com diversas espécies reativas de oxigênio em um mesmo momento (HOCl, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) além de todo o sistema lipídico e proteico celular, o que altera a interação da NIC com esses agentes oxidantes, como também possivelmente os seus efeitos. Os sistemas celulares completos são mais fidedignos de apresentar um modelo relacionado aos agentes oxidantes produzidos no nosso organismo.

Tabela 1. Efeito da NIC sobre LPMN (1×10^6 0,1 mL⁻¹) estimulados por zymosan (0,05 mg 0,1 mL⁻¹) ou quiescentes. Os resultados estão expressos em % de células que incorporaram o corante azul de trypan (células não-viáveis) na ausência ou presença de NIC (molar) em tampão PBS-D a 37°C incubados por 30 min.

Sistema	% células não-viáveis
Somente células	5 ± 0,7
células + Estímulo	76 ± 0,3 *
células + NIC 10 ⁻³	10 ± 5,6**
células + NIC 10 ⁻⁴	18 ± 0,7**
células + NIC 10 ⁻⁵	12 ± 0,7**
células + NIC 10 ⁻³ + Estímulo	6 ± 1,7***
células + NIC 10 ⁻⁴ + Estímulo	9 ± 1,0***
células + NIC 10 ⁻⁵ + Estímulo	15 ± 4,6***

*p < 0,05 quando comparado somente células com células + Estímulo. **p < 0,05 quando comparado somente células com células + NIC. ***p < 0,05 quando comparado células + NIC + Estímulo com células + Estímulo.

Tabela 2. Efeito da NIC sobre macrófagos (1×10^6 0,1 mL⁻¹) estimulados por zymosan (0,05 mg 0,1 mL⁻¹) ou quiescentes. Os resultados estão expressos em % de células que incorporaram o corante azul de trypan (células não-viáveis) na ausência ou presença de NIC (molar) em tampão PBS-D a 37°C incubados por 30 min.

Sistema	% células não-viáveis
Somente células	6 ± 0,3
células + Estímulo	17 ± 0,7*
células + NIC 10 ⁻³	15 ± 5,6**
células + NIC 10 ⁻⁴	9 ± 3,2
células + NIC 10 ⁻⁵	9 ± 0**
células + NIC 10 ⁻³ + Estímulo	8 ± 0,7***
células + NIC 10 ⁻⁴ + Estímulo	8 ± 3,5***
células + NIC 10 ⁻⁵ + Estímulo	5 ± 4,6***

*p < 0,05 quando comparado somente células com células + Estímulo. **p < 0,05 quando comparado somente células com células + NIC. ***p < 0,05 quando comparado células + NIC + Estímulo com células + Estímulo.

Tabela 3. Efeito da NIC sobre LPMN (1×10^6 0,1 mL⁻¹) estimulados por PMA (10⁻⁷M) ou quiescentes. Os resultados estão expressos em % de células que incorporaram o corante azul de trypan (células não-viáveis) na ausência ou presença de NIC (molar) em tampão PBS-D a 37°C incubados por 30 min.

Sistema	% células não-viáveis
Somente células	5 ± 0,3
células + Estímulo	17 ± 4,9*
células + NIC 10 ⁻³	9 ± 0*
células + NIC 10 ⁻⁴	8 ± 5,1
células + NIC 10 ⁻⁵	7 ± 5,3
células + NIC 10 ⁻³ + Estímulo	5 ± 0,3***
células + NIC 10 ⁻⁴ + Estímulo	3 ± 0,3***
células + NIC 10 ⁻⁵ + Estímulo	2 ± 0,3***

*p < 0,05 quando comparado somente células com células + Estímulo. **p < 0,05 quando comparado somente células com células + NIC. ***p < 0,05 quando comparado células + NIC + Estímulo com células + Estímulo.

Tabela 4. Efeito da NIC sobre macrófagos (1×10^6 0,1 mL⁻¹) estimulados por PMA (10⁻⁷M) ou quiescentes. Os resultados estão expressos em % de células que incorporaram o corante azul de trypan (células não-viáveis) na ausência ou presença de NIC (molar) em tampão PBS-D a 37°C incubados por 30 min.

Sistema	% células não-viáveis
Somente células	6 ± 0,3
células + Estímulo	17 ± 0,7*
células + NIC 10 ⁻³	15 ± 5,6**
células + NIC 10 ⁻⁴	10 ± 3,1
células + NIC 10 ⁻⁵	10 ± 6,7
células + NIC 10 ⁻³ + Estímulo	11 ± 3,2***
células + NIC 10 ⁻⁴ + Estímulo	7 ± 0,3***
células + NIC 10 ⁻⁵ + Estímulo	12 ± 1,1***

*p < 0,05 quando comparado somente células com células + Estímulo. **p < 0,05 quando comparado somente células com células + NIC. ***p < 0,05 quando comparado células + NIC + Estímulo com células + Estímulo.

Conclusão

A NIC promoveu significativa diminuição da citotoxicidade de LPMN e macrófagos estimulados, sendo que esse efeito foi mais pronunciado nos LPMN. A redução na citotoxicidade favorece a sobrevivência da célula e a possível exacerbação de seus efeitos deletérios, pelo maior tempo de liberação de espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas, que podem amplificar os efeitos desses sistemas na célula, especialmente se os fagócitos estiverem ativadas. Mais estudos são necessários para melhor compreensão dos resultados obtidos e das possíveis interações analisadas.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, pelo financiamento do trabalho por meio do Programa de Infraestrutura para Jovens Pesquisadores-Programa Primeiros Projetos – PPP/2006.

Referências

- AOSHIBA, K.; NAGAI, A.; YASUI, S.; KONNO, K. Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 127, n. 2, p. 186-194, 1996.
- BENOWITZ, N. L. Nicotine addiction. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 2295-2303, 2010.
- CHOW, C.-W.; HERRERA, M. T.; SUZUKI, T.; DOWNEY, G. P. Oxidative stress and acute lung injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 427-431, 2003.
- DAVIES, B. D.; HOSS, W.; LIN, J. P.; LIONETTI, F. Evidence for a noncholinergic nicotine receptor on human phagocytic leukocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 23-31, 1982.
- DOMAGALA-KULAWIK, J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, suppl. 6, p. 19-34, 2008.
- GILLESPIE, M. N.; OWASOYA, J. O.; KOJIMA, S.; JAY, M. Enhanced chemotaxis and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes from nicotine treated and smoke exposed rats. **Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 45-52, 1987.
- HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 2, p. 214-224, 2006.
- KAWAI, Y.; MORINAGA, H.; KONDO, H.; MIYOSHI, N.; NAKAMURA, Y.; UCHIDA, K.; OSAWA, T. Endogenous formation of novel halogenated 2'-deoxycytidine. Hypohalous acid-mediated DNA modification at the site of inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51241-51249, 2004.
- KEATINGS, V. M.; COLLINS, P. D.; SCOTT, D. M.; BARNES, P. J. Differences in interleukin-8 and tumor

- necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 153, n. 2, p. 530-534, 1996.
- KOUGIAS, P.; CHAI, H.; LIN, P. H.; YAO, Q.; LUMSDEN, A. B.; CHEN, C. Defensins and cathelicidins: neutrophil peptides with roles in inflammation, hyperlipidemia and atherosclerosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 3-10, 2005.
- MALLE, E.; FURTMULLER, P. G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development?. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 6, p. 838-854, 2007.
- MASUDA, M.; SUZUKI, T.; FRIESEN, M. D.; RAVANAT, J. L.; CADET, J.; PIGNATELLI, B.; NISHINO, H.; OHSHIMA, H. Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils. Catalysis by nicotine and trimethylamine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 40486-40496, 2001.
- MEYER, D. H.; CROSS, C. E.; IBRAHIM, A. B.; MUSTAFA, M. G. Nicotine effects on alveolar macrophage respiration and adenosine triphosphatase activity. **Archives of Environmental Health**, v. 22, n. 3, p. 363-365, 1971.
- NAKAJIMA, M.; ITOH, M.; YAMANAKA, H.; FUKAMI, T.; TOKUDOME, S.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, H.; YOKOI, T. Isoflavones inhibit nicotine C-oxidation catalyzed by human CYP2A6. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 337-344, 2006.
- OGUNBIYI, P. O.; MISRA, H. P. Alterations of guinea pig alveolar macrophage oxidative metabolism by nicotine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 98, n. 1, p. 25-30, 1989.
- PALMER, R. M.; WILSON, R. F.; HASAN, A. S.; SCOTT, D. A. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, suppl. 6, p. 180-195, 2005.
- REPINE, J. E.; BAST, A.; LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, n. 2, p. 341-157, 1997.
- SUZUKI, T.; OHSHIMA, H. Nicotine-modulated formation of spiroiminodihydantoin nucleoside via 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in 2'-deoxyguanosine-hypochlorous acid reaction. **FEBS Letters**, v. 516, n. 1-3, p. 67-70, 2002.
- TERASHIMA, T.; KLUT, M. E.; ENGLISH, D.; HARDS, J.; HOGG, J. C.; VAN EEDEN, S. F. Cigarette smoking causes sequestration of polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow in lung microvessels. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 171-177, 1999.
- VELLOSA, J. C. R.; KHALIL, N. M.; FONSECA, L. M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Does cotinine act upon reactive oxygen species and peroxidases? **Eclética Química**, v. 32, n. 1, p. 65-70, 2007.
- WETSCHER, G. J.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D.; PERDIKIS, G.; HINDER, P. R.; GLASER, K.; HUNDER, R. A. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 5, p. 877-882, 1995.

Received on September 9, 2010.

Accepted on April 5, 2011.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.