

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DA FUMAÇA DE CIGARRO EM LEUCÓCITOS HUMANOS

José Paulo von Brock de Freitas, Raul de Oliveira Souza,

Michel Mansur Machado, Luís Flávio Souza de Oliveira*

Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiiana, Uruguaiiana – Rio Grande do Sul

*E-mail: tcheluisoliveira@gmail.com

Submetido em: 26/06/2015

Aceito em: 11/05/2016

Publicado em: 30/09/2016

Resumo

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável no mundo. Estima-se que um terço da população mundial adulta, um bilhão e 200 milhões de pessoas, seja fumante. Diante desses dados, torna-se importante avaliar os danos causados pela exposição a este agente, o que inclui diferentes tipos celulares. Este estudo buscou avaliar *in vitro* o efeito citotóxico e os níveis de peroxidação lipídica em leucócitos humanos expostos à fumaça de cigarros, simulando ambiente fechado destinado a fumantes, onde foram utilizados os testes de viabilidade celular e TBARS. Os resultados demonstraram que todas as marcas testadas causaram diminuição significativa da viabilidade leucocitária e aumento da concentração de malondialdeído, quando comparados ao controle negativo. Entretanto, esta redução da viabilidade celular não pode ser atribuída exclusivamente aos níveis de peroxidação lipídica, mas, possivelmente, ao conjunto de compostos presentes na fumaça dos cigarros, alguns destes expressos no rótulo.

Palavras-chave: Produtos do Tabaco, Peroxidação lipídica, Sobrevivência celular, Leucócitos.

In vitro evaluation of the influence of cigarette smoke in human leukocytes

Abstract

Smoking is the leading cause of preventable death worldwide, according to the World Health Organization (WHO). It is estimated that one-third of adult worldwide population, that is, 1.2 billion people are smokers. Because of this, it is relevant to evaluate the damage caused by exposure to cigarette smoke, which includes different cellular types. In line with this, the present study assessed *in vitro* the cytotoxic effect and peroxidation levels of human leukocytes exposed to cigarette smoke simulating a closed environment for smokers, through the cellular viability test and TBARS. The results found showed that all cigarette trademarks tested caused a significant decrease in leukocyte viability and an increase in the malondialdehyde concentration, when compared to the negative control. However, this cell viability decrease cannot be attributed solely to the lipid peroxidation levels, but possibly to the set of compounds found in cigarette smoke, some of these stated on the label thereof.

Keywords: Tobacco Products, Lipid Peroxidation, Cell Survival, Leukocytes.

Evaluación *in vitro* de la influencia del humo del cigarrillo en leucocitos humanos

Resumen

El tabaquismo es considerado por la Organización Mundial de la salud (OMS) la principal causa de muerte evitable en el mundo. Se estima que un tercio de la población mundial adulta, 1,2 billones de personas, es un fumante. Sobre estos datos, es importante analizar los daños causados por la exposición a este agente, lo que incluye diferentes tipos celulares. Este estudio buscó evaluar *in vitro* el efecto citotóxico y los niveles de peroxidación lipídica en leucocitos humanos expuestos al humo del

cigarro, simulando ambiente cerrado destinado a fumantes, en los que fueron usados testes de viabilidade celular TBARS. Los resultados obtenidos demostraron que todas las marcas probadas causaron una disminuci3n significativa de la viabilidade del leucocito y aumentaron la concentraci3n de malondialdehido, en comparaci3n con el control negativo. Sin embargo, esta reducci3n en la viabilidade celular no puede atribuirse exclusivamente a los niveles de peroxidaci3n lipidica, sino posiblemente al conjunto de compuestos presentes en el humo de los cigarrillos, algunos de estos expuestos en la etiqueta.

Palabras-clave: Productos del tabaco, Peroxidaci3n lipidica, Supervivencia celular, Leucocitos.

INTRODUÇÃO

A Organiza3n Mundial de Saude (OMS) considera o tabagismo como a principal causa de morte evitavel no mundo. Este panorama tende a se agravar considerando-se a estimativa de que um terço da popula3n mundial adulta seja fumante. Este dado e corroborado pela estimativa anual de seis milh3es de mortes, sendo que cinco milh3es destas s3o decorrentes do consumo direto e, 600 mil, por inala3n passiva em ambientes compartilhados, como bares, restaurantes e escrit3rios. Caso essa estatística seja mantida, o n3mero de 3bitos anuais pelo uso do tabaco pode aumentar de 5,6 para, aproximadamente, oito milh3es de mortes at3 2030⁽¹⁾.

Apesar desses dados alarmantes, o que se percebe e o aumento progressivo do consumo de tabaco em países em desenvolvimento, que tem sido favorecido pelas faltas de controle de sua comercializa3n e incipiência de políticás de combate ao tabagismo. Al3m disso, boa parte da dissemina3n do consumo resulta das novas realidades trazidas pela globaliza3n da economia, que inserem de forma r3pida novas tecnologias de produ3n, associadas a estrat3gias de *marketing* que sensibilizam, por dia, 80% dos 100 mil jovens que s3o inicializados à pr3tica de fumar. Adicional e curiosamente, o tabagismo apresenta uma rela3n direta com a baixa renda e o baixo nívél de escolaridade desses jovens, o que corrobora para o surgimento de doenças incapacitantes em médio e longo prazos⁽²⁾. Portanto, e perfeitamente aceitavel afirmar que o tabagismo traz impactos sobre a saude dos individuos, como também impacta sobre a base orçamentária da saude pública.

No Brasil, o estudo mais recente divulgado para estimar a prevalência de tabagismo foi concluído em 2008: um inquérito telef3nico que cobriu as 27 capitais dos Estados brasileiros e que apresentou uma prevalência de 15,2% entre individuos acima de 18 anos⁽³⁾.

E bem estabelecido que, em humanos, todos os tecidos s3o afetados pelas mais de quatro mil substâncias liberadas na combust3n do tabaco. Destas, ao menos 250 s3o t3xicas e 50 s3o cancerígenas. Tais substâncias, como a nicotina, o mon3xido de carbono e o alcatr3n, corroboram para o aparecimento de quadros mórbidos e de morte antecipada⁽¹⁾. Essa agress3n molecular leva em considera3n tanto a exposi3n ativa quanto a passiva – como em locais fechados, ficando o grau de agress3n resguardado, principalmente, pelo tempo e pela intensidade de exposi3n.

Paralelamente, o sistema imunol3gico desempenha papel singular na homeostase corporal, uma vez que as respostas imunes cooperam com a prote3n e garantem, até certo ponto, a manuten3n da viabilidade da fun3n dos tecidos. Tais a3n3es s3o intermediadas por células como os linf3citos, os quais s3o responsáveis pela media3n química das respostas imunol3gicas, que atuam nas rea3n3es de fase aguda, na resposta ao estresse e no equilíbrio entre processos pró e anti-inflamat3rios⁽⁴⁾.

Este estudo teve como objetivo avaliar os nívéis de citotoxicidade e de peroxidaci3n lipidica em leuc3citos humanos expostos à fumaça de cigarro, simulando área de ambiente fechado e compartilhado, que corroborou com a gera3n de dados que permitam avaliar a viabilidade celular de leuc3citos frente a processos de intoxica3n por combust3n de tabaco.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais realizados neste trabalho, incluindo a coleta de amostras de sangue venoso, foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (RS), sob o número de registro 0089.0.243.000-07.

Preparo das amostras

Para a avaliação da citotoxicidade e de lipoperoxidação – teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi preparada uma suspensão de células leucocitárias humanas (10^6 células/mm³) em tampão PBS pH 7,4, 25°C, que foram submetidas à exposição a 0, 60, 120 e 180 min à fumaça de combustão de duas unidades de cigarros de três diferentes marcas comercializáveis (M1, M2 e M3, dispostas na Tabela 1) em aparato experimental fechado com volume de 0,048 m³, com exceção dos controles.

Tabela 1. Concentrações dos componentes expressos nas carteiras de cigarro.

Marcas de Cigarro	Componentes (mg/cigarro)		
	Alcatrão	Nicotina	CO
M1	4	0,4	4
M2	10	0,8	10
M3	7	0,6	6

Os controles foram mantidos em igual modelo de aparato, porém, sem exposição à fumaça. A delimitação da área do aparato experimental baseou-se na média de tamanho de algumas áreas de fumantes de estabelecimentos de entretenimento na região, conhecidos por alguns estudantes da Unipampa - Campus de Uruguaiana. Todos os testes foram realizados com amostras em triplicata, com 2,5 mL cada uma, e respeitaram a mesma divisão de grupos: controle negativo (CN), composto da suspensão leucocitária (SL) para os testes de citotoxicidade e TBARS; controle positivo (CP), composto da SL acrescidos de H₂O₂ 4 mM para o teste de citotoxicidade; testes, compostos da SL submetidos à exposição de fumaça de cigarros.

Avaliação da citotoxicidade

Para avaliar os efeitos citotóxicos da combustão do tabaco sobre leucócitos humanos mononucleados, foi utilizado o teste de inviabilidade celular, por meio da perda da integridade da membrana, utilizando o método do Azul de Tripan⁽⁵⁾. Brevemente, a 100 µL de SL, após período de exposição supracitado, foram acrescidos 100 µL do corante de Azul de Tripan, homogeneizado, incubado à temperatura ambiente por 3 min, contadas 300 células por amostra em câmara de Neubauer, aumento de 40X, para produzir escore de células viáveis (não coradas ou coradas fracamente de azul) e células inviáveis (coradas fortemente de azul). Os resultados foram expressos em percentual de células inviáveis.

Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi realizada por meio de técnica clássica, com algumas modificações, utilizando as mesmas divisões de grupo para o teste de viabilidade celular, em que a peroxidação foi quantificada por espectrofotometria, a partir da reação dos lipídeos presentes nas respectivas amostras a 95°C, com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em comprimento de onda de 512 nm⁽⁶⁾.

Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada segundo protocolo de kit comercial, marca Labtest®, o qual utiliza a reação com biureto, em que as ligações peptídicas das proteínas reagem com íons cúpricos em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta, que é proporcional ao teor das proteínas no meio. No término da reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em 545 nm. O intuito de dosá-las foi em função do teste que avaliou a peroxidação lipídica.

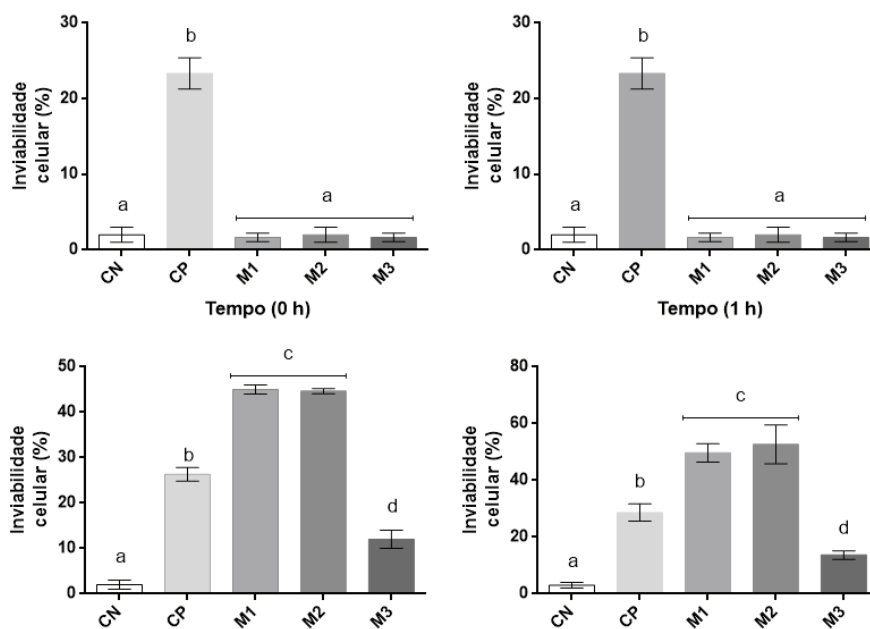
Análise estatística

Os dados obtidos dos protocolos foram tratados por análise de variância (Anova) de uma via, completada pelo teste de múltipla comparação de Tukey, os resultados são expressos em média do erro padrão sendo considerados significativos os resultados com $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são mostrados os diferentes níveis de citotoxicidade, caracterizados pelo percentual de células inviáveis, após curva de exposição à fumaça de combustão de cigarros das três marcas comerciais distintas utilizadas neste estudo.

Figura 1. Percentual de células leucocitárias humanas inviáveis após exposição à fumaça de cigarros das marcas M1, M2 e M3.



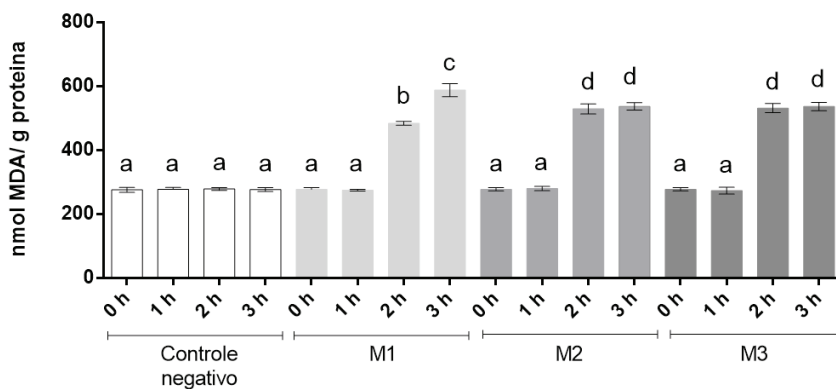
As letras sobscritas sobre as colunas expressam diferenças estatísticas significativas entre os grupos; CN = controle negativo, CP = controle positivo.

Como pode ser observado, nos tempos 0 e 1 h não foi observado nível de citotoxicidade diferente do encontrado para o controle negativo (Figura 1A/B). Contudo, no tempo de 2 e 3 h de exposição, os níveis de citotoxicidade das marcas M1(45%) e M2 (45%) foram superiores ao encontrado, nestes mesmos períodos, para o controle positivo (26%) ($p < 0,05$) (Figura 1C/D). Em relação à fumaça produzida pelos cigarros da marca M3 (12%), os níveis de citotoxicidade a partir de 2 h de exposição foram maiores que o encontrado para o controle negativo (2%), porém, menores que o controle positivo (Figura 1C/D). Interessante notar que não houve aumento expressivo da citotoxicidade inferida pelas marcas M1 (51%) e M2 (53%) entre os tempos de 2 e 3 h de incubação, tampouco alteração significativa no nível de citotoxicidade de M3 (14%), considerando os dois últimos períodos de incubação.

Na Figura 2 são mostrados os diferentes níveis de lipoperoxidação após curva de exposição à fumaça de combustão de cigarros. Como pode ser observado, nos tempos 0 e 1 h não foi observado nível de lipoperoxidação diferente do encontrado no controle negativo. Contudo, nos tempos de 2 e 3 h de exposição, os níveis de lipoperoxidação das marcas M1, M2 e M3 aumentaram significativamente, com uma elevação aproximada de 52% nos níveis de malondialdeído nestes mesmos períodos, quando comparados ao controle negativo ($p < 0,001$).

Em relação à fumaça produzida pelos cigarros da marca M1, os níveis de lipoperoxidação após 2h de exposição foram menores (485 nmol MDA/g de proteína) que o encontrado para M2 (534 nmol MDA/g de proteína) e M3 (538 nmol MDA/g de proteína), porém, após 3h de exposição, os níveis de M1 (579 nmol MDA/g de proteína) demonstraram-se superiores às marcas M2 e M3 (537 e 543 nmol MDA/g de proteína, respectivamente) ($p < 0.01$).

Figura 2. Lipoperoxidação em células leucocitárias humanas após exposição à fumaça de cigarros das marcas M1, M2 e M3.



As letras sobrescritas sobre as colunas expressam diferenças estatísticas significativas entre os grupos; CN = controle negativo, CP = controle positivo.

De acordo com os dados obtidos, pode-se observar que um dos mecanismos de dano leucocitário após exposição à fumaça de combustão de cigarro se dá pela peroxidação lipídica, embora não seja o único, pois se observam diferenças nos níveis de citotoxicidade e que, no caso da marca M3, o nível de lipoperoxidação é semelhante à M2. Dessa forma, fica evidente que os componentes presentes na fumaça de combustão dos cigarros das marcas estudadas são capazes de induzir lesões às células leucocitárias humanas por vias e intensidade diferentes.

Adicionalmente, alguns estudos demonstram que os compostos que trazem mais malefícios à saúde pela combustão do tabaco são o monóxido de carbono, o alcatrão e a nicotina⁽⁷⁾.

Alguns autores têm mostrado os efeitos do tabaco nos diferentes componentes do sistema imune⁽⁸⁾. Estudos realizados *in vivo* demonstraram diminuição da capacidade de fagocitose, redução na quimiotaxia e diapedese dos neutrófilos, assim como redução dos títulos de IgA, IgM e IgG, além da diminuição da viabilidade de linfócitos T⁽⁹⁾.

No que diz respeito a um de seus componentes - a nicotina, estudos *in vitro* observaram que essa droga interfere com as funções dos neutrófilos, como, por exemplo, na diminuição da atividade da mieloperoxidase⁽¹⁰⁾. Esta também demonstrou, *in vivo*, provocar anulação da proteção neurotóxica da metilfeniltetra-hidropiridina e, em humanos, foi constatado clinicamente que a nicotina foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de dopamina⁽¹¹⁾.

Não menos importante, dentro do aspecto toxicológico, o alcatrão contém vários compostos ou elementos contaminantes, como os íons metálicos, dentre eles: cádmio, chumbo, níquel e arsênico. A partir do alcatrão, também podem aparecer na fumaça contaminantes como os agrotóxicos p-clorofenil e diclorodifeniltricloroetano (DDT), este último, com o uso proibido no Brasil⁽¹²⁾. Além disso, na fumaça contém hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), tais como o benzopireno, dibenzopireno e benzantraceno, que têm ação oncoincidiadora comprovada⁽¹³⁾. O benzopireno é considerado um potente carcinógeno⁽⁷⁾, propriedade que está diretamente relacionada à sua extensa biotransformação, que gera metabólitos ativos passíveis de desencadear mutagenicidade, carcinogenicidade e necrose⁽¹⁴⁾.

Em relação ao terceiro componente citado quanto ao grau de relevância toxicológica, o CO, seu principal efeito deletério está relacionado à indução de hipóxia celular⁽¹⁵⁾.

Adicionalmente, foi observado que a fumaça de cigarro causa destruição celular por estresse oxidativo⁽¹⁶⁾, o qual se fundamenta pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO, por sua vez, são capazes de reagir e modificar estruturas moleculares de células, como fosfolipídios, ácidos graxos, colesterol, glicídeos, proteínas, RNA e DNA⁽¹⁷⁾.

Dentro do aspecto da geração de ERO, a peroxidação lipídica é, reconhecidamente, a maior fonte de produtos citotóxicos - como os aldeídos, produzidos pela decomposição de hidroperóxidos, de modo particular e quantitativo, advindos da peroxidação lipídica celular dos ácidos graxos linoleico, araquidônico e docosahexaenoico⁽¹⁸⁾.

Corroborando com esses dados, são atribuídos às ERO, geradas a partir da combustão do tabaco, os danos oxidativos de DNA em diferentes tipos celulares do tecido pulmonar de fumantes e ex-fumantes, bem como de indivíduos não fumantes, mas expostos à fumaça dessa combustão⁽¹⁹⁾.

Esses pressupostos incluem diferentes possibilidades e vias de imputar lesão celular, a partir da exposição à fumaça da combustão do tabaco, como a que ocorreu no presente estudo.

Curiosamente, não foi possível relacionar os níveis de citotoxicidade e lipoperoxidação lipídica observados no presente estudo com as diferentes concentrações de nicotina, alcatrão e CO, presentes nos rótulos das marcas de cigarro utilizadas. Esses achados, por sua vez, corroboram com estudo realizado com 1.540 indivíduos, de 18 a 44 anos de idade, consumidores de três tipos de cigarros (baixos, médios e altos teores de nicotina e alcatrão), em que, ao cabo de seis meses, revelou que, além de não haver praticamente diferenças nas concentrações de nicotina e cotinina (principal metabólito da nicotina) no sangue e na urina, os indivíduos estudados tiveram as mesmas manifestações sintomáticas respiratórias e os mesmos padrões de provas funcionais pulmonares⁽²⁰⁾.

Outro estudo realizado nos Estados Unidos constatou que, nos consumidores dos cigarros *light* e *ultra light*, o câncer de pulmão elevou-se 17 vezes nos homens e dez vezes nas mulheres, em comparação com não fumantes no período de 1959 a 1991. Ou seja, mesmo os cigarros de baixos teores têm elevada toxicidade⁽²¹⁾.

Estes estudos corroboram com nossos resultados, uma vez que a lipoperoxidação e a citotoxicidade geradas parecem ser dependentes de vários compostos, não só dos três componentes presentes nas informações dos fabricantes.

Embora nosso estudo tenha sido *in vitro*, buscou-se simular a exposição de fumantes em ambiente fechado. Obviamente, existem diferentes áreas ou espaços destinados a fumantes, alguns em situações mais críticas, outros em menos críticas quanto

à quantidade de fumaça gerada, e, por conseguinte, níveis de exposição diferenciados. Contudo, a inalação encontra uma rápida absorção dos componentes presentes na fumaça, o que faz com que, a partir do tecido sanguíneo, vários outros tecidos entrem em contato com essas substâncias e sofram seus efeitos diretos ou indiretos. De qualquer forma, os leucócitos estão, após as células do sistema respiratório, dentre as que entrarão em contato com esses compostos e ou elementos. Embora exista a necessidade de estudos complementares, nossos resultados demonstram claramente que após 2h de exposição de leucócitos à combustão de cigarros, os níveis de toxicidade celular passam a ser muito significativos, e que a peroxidação lipídica é um dos mecanismos pelos quais os leucócitos sofrem efeito deletério.

CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os resultados obtidos, é possível afirmar que todas as marcas testadas causaram dano significativo aos leucócitos ao induzirem oxidação dos lipídeos de membrana dos mesmos, como observado pelo teste TBARS.

Adicionalmente, o percentual de inviabilidade celular leucocitária, observado após exposição à fumaça de cigarros das marcas comerciais testadas, sob as condições experimentais realizadas, não é dependente exclusivamente da peroxidação lipídica, mas do conjunto de compostos potencialmente danosos às células.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Tobacco, Fact sheet N° 339. [Internet]. 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>.
2. World Health Organization (WHO), European Commission; WORLD BANK, 2003. Tobacco & Health in the Developing World: A Background Paper for the High Level Round Table on Tobacco Control and Development Policy., Brussels (Belgica); 2003.
3. Facina T; Organização Pan-Americana da Saúde, Instituto Nacional de Câncer (INCA). Pesquisa Especial de Tabagismo (PETab) – Relatório Brasil. Rev Bras Canc. 2011; 57(3): 429-430.
4. Tonet AC, Nóbrega OT. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. Rev Bras Geriatr Gerontol. 2008; 11(2): 259-273.
5. Burow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL, Krajewski S, Reed C, Hammond TG, Clejan S, Beckman BS. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor α -induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. Cancer Res. 1998; 58(21):4940-4946.
6. Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K. Assay for Lipid Peroxide in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. Anal Biochem. 1979; 95(2):351–358, 1979.
7. Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. Fundamentos de toxicologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2008.
8. Yang W, Ni H, Wang H, Gu H. NLRP3 inflammasome is essential for the development of chronic obstructive pulmonary disease. Int J Clin Exp Pathol. 2015 8(10): 13209-13216.
9. Zeller I, Hutcherson JA, Lamont RJ, Demuth DR, Gumus P, Nizam N, Budeneli N, Scott DA. Altered antigenic profiling and infectivity of *Porphyromonas gingivalis* in smokers and non-smokers with periodontitis. J Periodontol. 2014 85(6): 837-844.
10. Kim SJ, Kim SY, Kim JH, Kim DJ. Effects of smoking cessation on gene expression in human leukocytes of chronic smoker. Psychiatry Investig. 2014 11(3): 290-296.

11. Regassa G, Chandravanshi BS. Levels of heavy metals in the raw and processed Ethiopian tobacco leaves. SpringerPlus. 2016 5:232-241.
 12. Pérez-Ortuño R, Martínez-Sánchez JM, Fu M, Fernández E, Pascual JÁ. Evaluation of tobacco specific nitrosamines exposure by quantification of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone (NNK) in human hair of non-smokers. 2016 6:25043. Doi: 10.1038/srep25043.
 13. White AJ, Bradshaw PT, Herring AH, Teitelbaum SL, Beyea J, Stellman SD, Steck SE, Mordukhovich I, Eng SM, Engel LS, Conway K, Hatch M, Neugut AI, Santella RM, Gammon MD. Exposure to multiple sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer incidence. *Environ Int.* 2016 89-90: 185-192.
 14. Sandeber A, SKöld CM, Grunewald J, Eklund A, Wheelock AM. Assessing recent smoking status by measuring exhaled carbon monoxide levels. *PlosOne.* 2011 6(12): e28864.
 15. Napierala M, Merritt TA, Mazela J, Jablecka K, Miechowicz I, Marszalek A, Florek E. The effect of tobacco smoke on oxytocin concentrations and selected oxidative stress parameters in plasma during pregnancy and post-partum – an experimental model. *Hum Exp Toxicol.* 2016 doi: 10.1177/0960327116639363.
 16. Srivastava KC, Austin RD, Shrivastava D. Evaluation of oxidant-antioxidant status in tissue samples in oral cancer: A case control study. 2016 13(2): 181-187.
 17. Andrade DR Jr, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J Bras Pneumol.* 2005; 31(1): 60-68.
 18. Withey CH, Papacosta AO, Swan AV, Fitzsimons BA, Ellard GA, Burney PG, et al. Respiratory effects of lowering tar and nicotine levels of cigarette smoked by young male middle tar smokers. II Results of a randomized controlled trial. *J Epidemiol Comm Health.* 1992; 46(3):285-285.
 19. National Institutes of Health, National Cancer Institute. "Light" Cigarettes and Cancer Risk. [atualizado em 28/10/2010; citado em 10/10/2014]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Tobacco/light-cigarettes>.
-