

## Increased oxidative stress in preschool children exposed to passive smoking

*Aumento do estresse oxidativo em pré-escolares expostos ao tabagismo passivo*

Faruk Yıldırım<sup>1</sup>, Kabil Sermetow<sup>2</sup>, Ali Aycicek<sup>3</sup>, Abdurrahim Kocyigit<sup>4</sup>, Ozcan Erel<sup>5</sup>

### Resumo

**Objetivos:** Estudar o efeito do fumo passivo sobre o estado plasmático oxidativo e antioxidativo em pré-escolares fumantes passivos e compará-los com controles.

**Métodos:** Trinta e quatro pré-escolares fumantes passivos (cinco a 50 cigarros/dia) (grupo de estudo) e 32 controles que nunca estiveram expostos à fumaça de cigarro foram escolhidos aleatoriamente entre crianças de 4 a 6 anos. Foram determinados os níveis de cotinina urinária e de indicadores do estado oxidativo e antioxidativo, isto é, estado oxidante total (EOT), capacidade antioxidante total (CAT) e índice de estresse oxidativo (IEO).

**Resultados:** A média do consumo ambiental de cigarros foi de  $22 \pm 13$  cigarros por dia nas crianças fumantes passivas. Os níveis médios de cotinina urinária foram  $77,6 \pm 41,4$  ng/mL e  $11,9 \pm 2,3$  ng/mL nos grupos de estudo e controle, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Os níveis médios da CAT plasmática foram  $0,95 \pm 0,13$  mmol equivalente de Trolox/L e  $1,01 \pm 0,09$  mmol equivalente de Trolox/L, respectivamente ( $p = 0,039$ ). Os níveis médios de EOT plasmático foram  $28,6 \pm 7,9$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalente/L e  $18,5 \pm 6,3$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalente/L, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Os níveis médios de IEO foram  $3,08 \pm 0,98$  unidade arbitrária e  $1,84 \pm 0,64$  unidade arbitrária, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Uma pequena quantidade de fumaça de cigarro (cinco a 10 cigarros/dia) causa estresse oxidativo considerável. Não houve correlações significativas entre o número de cigarros consumidos e os níveis de estado oxidante e de IEO.

**Conclusões:** O tabagismo passivo é um potente oxidante em pré-escolares. Seus efeitos deletérios não se limitam apenas tabagismo passivo pesado, mas também ocorrem com a exposição a pequenas quantidades de fumaça.

*J Pediatr (Rio J). 2011;87(6):523-8: Antioxidantes, cotinina, oxidantes, fumo passivo, pré-escolares.*

### Abstract

**Objectives:** To study the effect of passive cigarette smoking on plasma oxidative and antioxidative status in passive smoking preschool children and to compare them with controls.

**Methods:** Thirty-four passive smoking (five to 50 cigarettes per day) preschool children (study group) and 32 controls who had never been exposed to cigarette smoke were randomly chosen from children aged from 4 to 6 years. Urinary cotinine and plasma indicators of oxidative and antioxidative status, i.e., total oxidant status (TOS), total antioxidant capacity (TAC), and oxidative stress index (OSI), were determined.

**Results:** Mean environmental cigarette consumption was  $22 \pm 13$  cigarettes per day in passive smoking children. Mean urinary cotinine levels were  $77.6 \pm 41.4$  ng/mL and  $11.9 \pm 2.3$  ng/mL in the study and control groups, respectively ( $p < 0.001$ ). Mean plasma TAC levels were  $0.95 \pm 0.13$  mmol Trolox equivalent/L and  $1.01 \pm 0.09$  mmol Trolox equivalent/L, respectively ( $p = 0.039$ ). Mean plasma TOS levels were  $28.6 \pm 7.9$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalent/L and  $18.5 \pm 6.3$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalent/L, respectively ( $p < 0.001$ ). Mean OSI levels were  $3.08 \pm 0.98$  arbitrary units and  $1.84 \pm 0.64$  arbitrary units, respectively ( $p < 0.001$ ). A small amount of cigarette smoke (five to 10 cigarettes per day) causes considerable oxidative stress. There were significant correlations between number of cigarettes consumed and oxidant status and OSI levels.

**Conclusions:** Passive smoke is a potent oxidant in preschool children. Its deleterious effects are not limited just to heavy passive smoking, but also occur with exposure to small amounts of smoke.

*J Pediatr (Rio J). 2011;87(6):523-8: Antioxidants, cotinine, oxidants, passive smoking, preschool children.*

### Introdução

O principal efeito adverso do tabagismo ativo ou passivo é decorrente de numerosos compostos emitidos em gases, muitos dos quais são oxidantes e pró-oxidantes; além disso,

o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pela fumaça está relacionado ao aumento na produção de radicais livres, à redução nos níveis de antioxidantes séricos

1. MD. Pediatrician, Sanliurfa Children's Hospital, Pediatrics Clinic, Sanliurfa, Turquia.
2. MD. Associate professor, Harran University, Medical Faculty, Pediatrics Department, Sanliurfa, Turquia.
3. MD. Associate professor, Harran University, Medical Faculty, Pediatric Hematology Department, Sanliurfa, Turquia.
4. MD. Professor, Harran University, Medical Faculty, Clinical Biochemistry Department, Sanliurfa, Turquia.
5. MD. Professor, Ataturk Training and Research Hospital, Clinical Biochemistry Department, Ankara, Turquia.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

**Como citar este artigo:** Yıldırım F, Sermetow K, Aycicek A, Kocyigit A, Erel O. Increased oxidative stress in preschool children exposed to passive smoking. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(6):523-8.

Artigo submetido em 09.06.11, aceito em 28.08.11.

<http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2139>

e ao estresse oxidativo<sup>1-4</sup>. O aumento do estado oxidante pode resultar na oxidação lipídica, na indução da quebra da fita simples do DNA, na inativação de certas proteínas e na ruptura de membranas biológicas<sup>2,5,6</sup>, que estão associadas a numerosos efeitos adversos para a saúde de fetos, lactentes, crianças e adultos<sup>1,2,7-12</sup>.

A cotinina, que é o principal metabólito da nicotina, é um indicador comumente utilizado para refletir o nível de exposição à fumaça, embora sua meia-vida seja menor do que 24 horas. A cotinina urinária é um bom indicador, pois pode ser mensurada de forma simples e acurada e é detectável em amostras de urina em baixas concentrações<sup>13</sup>.

Relatamos previamente que a capacidade antioxidante total (CAT), o estado oxidante total (EOT) e o índice de estresse oxidativo (IEO) no tecido placentário fetal, no sangue de cordão umbilical e no soro dos lactentes e das suas mães são alterados pelo tabagismo ativo ou passivo<sup>1,2,8,9</sup>. No presente estudo, medimos o nível de cotinina para determinar o nível de exposição passiva ao cigarro e avaliamos o efeito do fumo passivo nos níveis de estado oxidante/antioxidante total em pré-escolares.

## **Materiais e métodos**

O grupo de estudo incluiu 45 pré-escolares (24 meninos, 21 meninas) com idade entre 4 e 6 anos (média: 5,2±0,7 anos) que tivessem sido expostos a pelo menos cinco cigarros por dia (variação: 5-45 cigarros/dia; média: 22±13 cigarros/dia) nos últimos 2 meses no ambiente doméstico. O grupo controle consistiu em 44 pré-escolares (26 meninos, 18 meninas) com idade entre 4 e 6 anos (média: 5,3±0,8 anos) de nível socioeconômico semelhante. As mães desses sujeitos relataram que as crianças nunca haviam sido expostas ao fumo passivo. Os indivíduos foram recrutados do ambulatório pediátrico da Harran University e do ambulatório pediátrico do Sanliurfa Children's Hospital entre fevereiro de 2010 e abril de 2010. Todos os indivíduos eram saudáveis, e nenhum havia ingerido qualquer medicamento antioxidante (vitamina C, vitamina E, selênio, etc.) ou bebido suco de frutas antes ou durante o estudo. Para avaliação de cada um dos indivíduos dos grupos de estudo e controle, foi obtido um breve histórico, foram coletadas amostras de sangue para contagem sanguínea completa e testes de função renal e hepática, e foi realizado um exame físico completo. As amostras de urina foram coletadas em um tubo estéril. As amostras de sangue foram retiradas em tubos heparinizados e o plasma foi separado das células por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. As amostras de urina e plasma foram armazenadas a -80 °C até serem requisitadas para análise. O plasma foi analisado para a determinação da CAT e do EOT. Os indivíduos com qualquer sinal ou sintoma de doença aguda ou crônica ou com resultados anormais nos testes bioquímicos foram excluídos do estudo.

Onze pacientes do grupo de estudo foram excluídos porque seus níveis de cotinina urinária eram inferiores a 25 ng/mL (média: 15,1 ng/mL; variação: 10,2-24,9 ng/mL), embora suas mães tivessem relatado que as crianças estiveram expostas a pelo menos cinco cigarros por dia. Isso pode ter

sido causado por fatores como grau de consumo de cigarros por parte da criança, índice de tabagismo, tipo de cigarro (com filtro ou sem filtro, de baixo alcatrão, com diferentes conteúdos de nicotina, etc.), proximidade do não fumante, duração da exposição, magnitude do espaço, sistema de ventilação da casa ou do trabalho, estação do ano, e muitas outras variáveis. Doze indivíduos do grupo controle foram excluídos porque seus níveis de cotinina urinária foram maiores do que 25 ng/mL (média: 37,6 ng/mL; variação: 25,1-59,4 ng/mL), embora suas mães tivessem relatado que as crianças nunca haviam sido expostas ao fumo passivo. As mães receberam todas as informações sobre o objetivo da investigação e consentiram com a participação do filho no estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Harran University e pelo Conselho Acadêmico Científico da Harran University.

## **Métodos analíticos**

Os níveis de cotinina urinária foram determinados por quimioluminescência, utilizando-se um *kit* comercial (*kit* de metabólito de nicotina Immulite 2000, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA) com um analisador automático de hormônios (sistema de imunoensaio Immulite 2000, Siemens, Chicago, EUA). Os níveis de cotinina urinária foram expressos em ng/mL. O ponto de corte da cotinina urinária para tabagismo passivo foi 25 ng/mL<sup>14</sup>. Os níveis de CAT e EOT foram medidos pelos métodos de Erel (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turquia), que são automatizados e colorimétricos<sup>15-17</sup>. O método EOT de Erel é baseado na oxidação do íon ferroso para íon férrico na presença de várias espécies oxidantes em meio ácido e na determinação do íon férrico pelo laranja de xilenol. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalente/L ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L)<sup>18</sup>. O método CAT de Erel é baseado no embranquecimento da cor característica de um radical catiônico mais estável de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) pelos antioxidantes. Os resultados foram expressos em mmol equivalente de Trolox/L (mmol equiv. de Trolox/L)<sup>19</sup>.

A porcentagem do nível de EOT em relação ao nível de CAT foi considerada como sendo o IEO<sup>17</sup>. O valor do IEO plasmático foi calculado da seguinte forma:  $\text{IEO} = [(\text{EOT}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./L}) / (\text{CAT}, \mu\text{mol equivalente de Trolox/L}) \times 100]$ <sup>7,17</sup>.

## **Análise estatística**

A variância da homogeneidade das variáveis foi testada pelo teste Levene. As diferenças nos valores da cotinina urinária e nos parâmetros plasmáticos entre os grupos de estudo e controle foram analisadas pelo teste *t* de Student. A razão entre os sexos foi comparada através de um teste do qui-quadrado. Associações bivariadas entre as variáveis foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do SPSS para Windows, versão 11.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

## Resultados

O grupo de estudo baseado nos níveis de cotinina consistiu em 34 pré-escolares (17 meninos, 17 meninas) com idade entre 4 e 6 anos (média: 5,2±0,8 anos). O grupo controle consistiu em 32 pré-escolares (19 meninos, 13 meninas) com idade entre 4 e 6 anos (média: 5,3±0,8). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto à média de idade, peso corporal, estatura, índice de massa corporal ou distribuição masculino/feminino ( $p > 0,05$ , Tabela 1).

A média do consumo ambiental de cigarro foi de 22±13 cigarros por dia nas crianças fumantes passivas. Os níveis médios de cotinina urinária foram de 77,6±41,4 ng/mL (variação: 25,7-168 ng/mL) e 11,9±2,3 ng/mL (variação: 10,1-22,8 ng/mL) nos grupos de estudo e controle, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Os níveis de CAT, EOT e IEO plasmáticos são apresentados na Tabela 2. Os níveis de CAT plasmática foram significativamente mais baixos no grupo de estudo do que no grupo controle (Figura 1A). Os níveis médios de CAT foram de 0,95±0,13 mmol equiv. de Trolox /L e 1,01±0,09 mmol equiv. de Trolox/L, respectivamente ( $p = 0,039$ ). Por

outro lado, os níveis de EOT e IEO plasmáticos foram significativamente mais altos no grupo de estudo do que no grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figuras 1B, 1C). Os níveis médios de EOT plasmático foram de 28,6±7,9  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L e 18,5±6,3  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L, respectivamente. Os níveis médios de IEO foram de 3,08±0,98 unidades arbitrárias (UA) e 1,84±0,64 UA, respectivamente. Tanto uma pequena quantidade (cinco a 10 cigarros/dia) de fumaça de cigarro como um baixo nível de cotinina urinária (25-50 ng/mL) causam estresse oxidativo importante ( $p \leq 0,002$ ). Foi encontrada uma correlação significativa positiva entre o número de cigarros a que as crianças estiveram expostas e os níveis de EOT e IEO ( $p < 0,001$ ) (Figura 2), mas não foi encontrada correlação entre a cotinina urinária e os parâmetros oxidativos ( $p > 0,05$ ).

## Discussão

Neste estudo, descobrimos que o equilíbrio oxidativo/antioxidativo pendeu fortemente para o lado oxidativo em pré-escolares fumantes passivos. Segundo nosso conheci-

**Tabela 1** - Comparação da idade, peso corporal, estatura e IMC de pré-escolares fumantes passivos e controles (dados expressos como média ± DP)

	Grupo de estudo (n = 34)	Grupo controle (n = 32)	p*
Idade (ano)	5,1±0,8	5,3±0,8	0,536
Peso corporal (kg)	17,9±2,9	17,9±2,9	0,717
Estatura (cm)	110,5±7,5	111,1±7,5	0,734
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	14,4±1,2	14,5±1,2	0,885
Gênero (masculino/feminino)	17/17	19/13	0,303†
Número de cigarros	22±13	NA	-

DP = desvio padrão; IMC = índice de massa corporal; NA = não se aplica.

\* Teste t de Student.

† Teste do qui-quadrado.

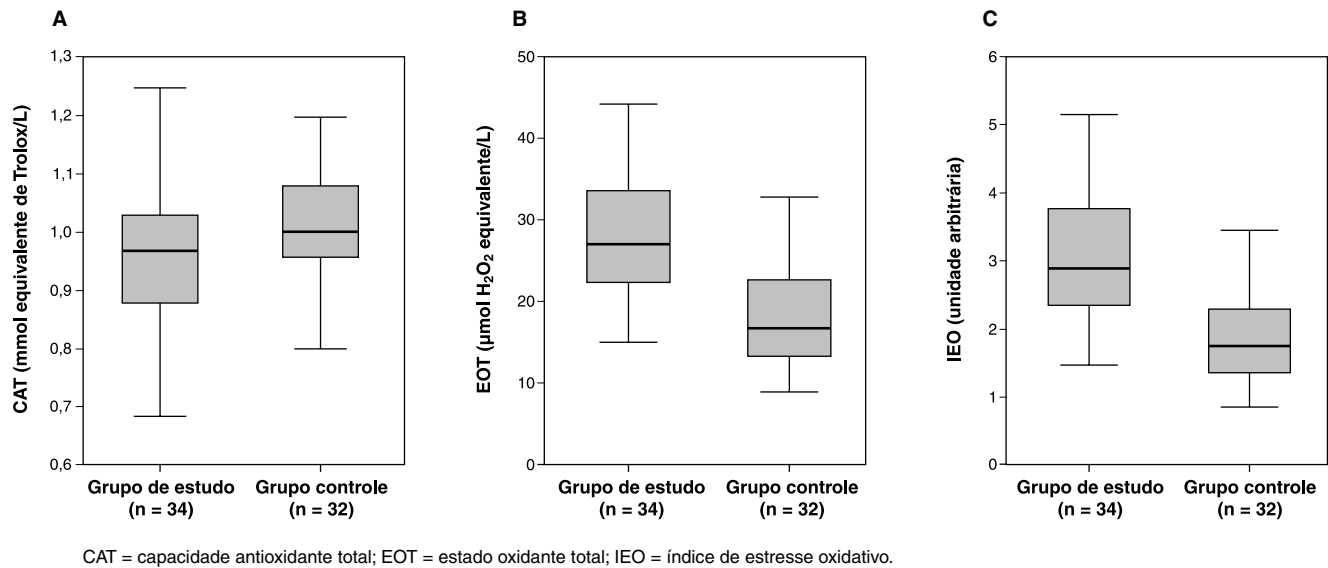
**Tabela 2** - Comparação dos parâmetros plasmáticos oxidativos e antioxidativos de pré-escolares fumantes passivos e controles (dados expressos como média ± DP)

	Grupo de estudo (n = 34)	Grupo controle (n = 32)	p*
Cotinina (ng/mL)†	77,6±41,4	11,9±2,3	< 0,001
CAT (mmol equiv. de Trolox/L)	0,95±0,13	1,01±0,09	0,039
EOT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./L)	28,6±7,9	18,5±6,3	< 0,001
IEO (UA)	3,08±0,98	1,84±0,64	< 0,001

CAT = capacidade antioxidante total; DP = desvio padrão; EOT = estado oxidante total; IEO = índice de estresse oxidativo; UA = unidade arbitrária.

\* Teste t de Student.

† Amostra de urina.



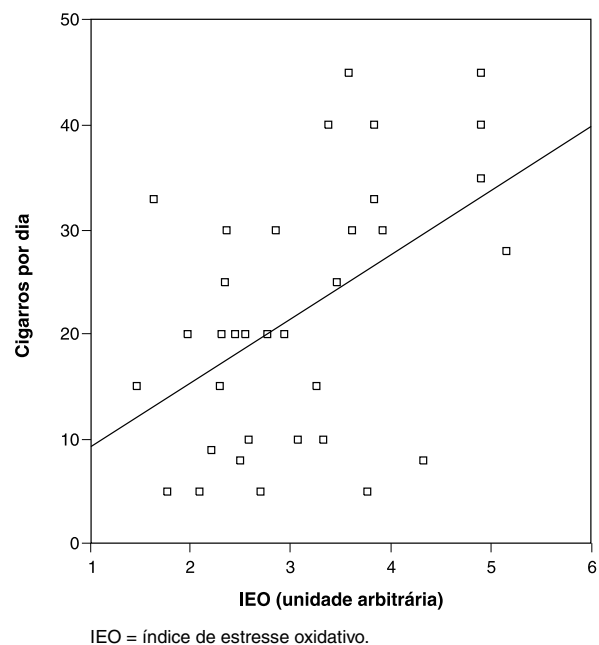
**Figura 1** - Gráfico *boxplot* dos níveis de CAT (A), EOT (B) e IEO (C) plasmáticos em pré-escolares fumantes passivos e controles

mento, todos os estudos publicados a respeito dos efeitos oxidantes/antioxidantes totais do fumo passivo analisaram o tecido placentário<sup>9</sup> e o sangue do cordão umbilical<sup>8</sup>, lactentes e suas mães<sup>1,2</sup>, e crianças em idade escolar<sup>10</sup>. Este é o primeiro relato que mostra a associação entre o aumento do estado oxidativo plasmático e o tabagismo passivo em crianças pré-escolares.

A exposição ao fumo passivo é muito comum e tem sido implicada como um fator de risco significativo para a saúde e como um hábito que traz consequências adversas para o estabelecimento e a progressão de várias doenças. As crianças são especialmente vulneráveis ao risco de tal exposição para a saúde, incluindo-se infecções respiratórias superiores e inferiores, infecções agudas e crônicas de ouvido, exacerbação da asma, alterações no neurodesenvolvimento, problemas comportamentais e diminuição no rendimento escolar<sup>20,21</sup>. Embora os mecanismos subjacentes envolvidos nas patologias associadas ao tabagismo ativo ou passivo sejam indiscutivelmente ainda um assunto a ser debatido, supõe-se que os danos oxidativos induzidos pelos radicais livres exerçam um papel fundamental na patogênese de numerosas doenças relacionadas ao tabagismo<sup>6,22,23</sup>. Os radicais livres têm a capacidade de induzir direta e indiretamente o estresse oxidativo no corpo. Os radicais livres originados da fumaça de cigarro são considerados uma causa importante de aterosclerose e câncer<sup>24</sup>. Cross et al. relataram que a fumaça do tabaco é uma fonte rica em oxidantes e em espécies reativas de oxigênio<sup>25</sup>. Nossos resultados demonstraram que ocorrem importantes alterações na CAT em pré-escolares fumantes passivos.

As quantidades de substâncias químicas derivadas da fumaça (por exemplo, óxido de nitrogênio, nicotina, monóxido de carbono e vários carcinógenos) no ambiente dependem de muitos fatores, tais como número de fumantes, grau de

consumo de cigarros, índice de tabagismo, tipo de cigarro (com filtro ou sem filtro, de baixo alcatrão, com diferentes conteúdos de nicotina, etc.), proximidade do fumante passivo, duração da exposição, magnitude do espaço, sistema de ventilação da casa ou do trabalho, estação do ano, e muitas outras variáveis<sup>26</sup>. Todos esses fatores, combinados



**Figura 2** - Gráfico de correlação dos níveis de IEO e o número de cigarros consumidos por dia ( $r = 0,479$ ,  $p = 0,003$ )

com os resultados dos nossos estudos, nos levam a concluir que são necessários mais estudos para identificar com mais clareza os efeitos do tabagismo passivo no sistema oxidante/antioxidante.

Um indicador de exposição à fumaça de cigarro deve ser mensurável e representar a magnitude, a duração e a frequência da exposição<sup>20</sup>. A cotinina urinária é um bom indicador, pois varia de acordo com a potência da fonte de exposição, pode ser determinada de forma simples e acurada por um custo acessível, e é detectável em amostras de urina em baixas concentrações<sup>13</sup>. Neste estudo, medimos o nível de cotinina para determinar o nível de exposição passiva ao cigarro em pré-escolares. Os pais fumavam uma média de 22 cigarros por dia e o nível médio de cotinina urinária das crianças foi de 77 ng/mL, embora não tenha sido encontrada correlação entre o estado oxidante e o nível de cotinina. No entanto, foi observada uma correlação positiva entre o número de cigarros fumados e o EOT. Essa correlação pareceu ser mais pronunciada no número de cigarros do que no nível de cotinina. Embora o relato materno possa ser menos acurado do que a determinação dos níveis de cotinina, não foi verificada correlação entre a quantidade relatada de fumo e os níveis mensuráveis de cotinina. Além disso, em nosso estudo prévio, não foi encontrada correlação entre a cotinina e outros parâmetros<sup>1</sup>.

O estudo foi limitado pelo fato de que a creatinina e a gravidade específica (densidade relativa) não foram mensuradas; ambas possibilitam que diferenças na concentração urinária sejam levadas em conta na determinação das concentrações de cotinina urinária. Este estudo demonstrou que avaliar os níveis de cotinina urinária sem medir os níveis de creatinina urinária ou de gravidade específica não é mais confiável do que avaliar relatos dos pais sobre os níveis de exposição ao cigarro. As medidas dos produtos bioquímicos cotinina e creatinina na urina são geralmente ajustadas para levar em conta a influência da hidratação. Tais ajustes tradicionalmente dependiam das medidas de creatinina ou da gravidade específica na amostra avaliada, e os valores finais eram expressos como a razão entre o produto bioquímico e a creatinina ou a gravidade específica<sup>27</sup>. A gravidade específica pode ser mensurada de forma rápida, confiável e econômica - características especialmente atraentes para o uso clínico rotineiro<sup>27</sup>.

Os valores dos produtos da peroxidação lipídica podem ser utilizados como um indício da geração de radicais livres de oxigênio. A determinação do EOT fornece um indício preciso de peroxidação lipídica e de estresse oxidativo<sup>17,19</sup>. Tem-se afirmado que o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio associado ao fumo pode exceder a capacidade do sistema de defesa oxidante, resultando em dano oxidativo a certas proteínas, lipídios e ao DNA<sup>23,28</sup>. Em lactentes expostos ao tabagismo passivo, vários componentes do sistema de defesa antioxidante foram apontados como deficientes, se comparados aos dos lactentes não expostos ao tabagismo passivo<sup>2,9,19,29</sup>. Assim como nossos estudos prévios, este estudo demonstrou que os níveis de EOT foram significativamente maiores nos fumantes passivos. Além desse marcador oxidativo, o IEO, que é um marcador significativo tanto de poder oxidante como de

antioxidante, elevou-se significativamente nos pré-escolares fumantes passivos.

Conclui-se que o tabagismo parental passivo está associado a importantes alterações no equilíbrio plasmático oxidante/antioxidante e causa potente estresse oxidativo.

## Agradecimentos

Agradecemos ao corpo técnico do laboratório e do ambulatório do Sanliurfa Children's Hospital e ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Harran University por seu auxílio na realização deste estudo.

## Referências

1. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int*. 2005;47:635-9.
2. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr*. 2005;164:775-8.
3. Fayol L, Gulian JM, Dalmaso C, Calaf R, Simeoni U, Millet V. Antioxidant status of neonates exposed in utero to tobacco smoke. *Biol Neonate*. 2005;87:121-6.
4. Polidori MC, Mecocci P, Stahl W, Sies H. Cigarette smoking cessation increases plasma levels of several antioxidant micronutrients and improves resistance towards oxidative challenge. *Br J Nutr*. 2003;90:147-50.
5. Durak I, Elgün S, Kemal Bingöl N, Burak Cimen MY, Kagmaz M, Büyükkocak S, et al. Effects of cigarette smoking with different tar content on erythrocyte oxidant/antioxidant status. *Addict Biol*. 2002;7:255-8.
6. Liu X, Lu J, Liu S. Synergistic induction of hydroxyl radical-induced DNA single-strand breaks by chromium (VI) compound and cigarette smoke solution. *Mutat Res*. 1999;440:109-17.
7. Arab K, Steghens JP. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylene orange method. *Anal Biochem*. 2004;325:158-63.
8. Aycicek A, Ipek A. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in cord blood. *Eur J Pediatr*. 2008;167:81-5.
9. Aycicek A, Varma M, Ahmet K, Abdurrahim K, Erel O. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in placental tissue. *Eur J Pediatr*. 2011;170:645-51.
10. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*. 2005;100:61-4.
11. Weiss ST, Tager IB, Schenker M, Speizer FE. The health effects of involuntary smoking. *Am Rev Respir Dis*. 1983;128:933-42.
12. Valenzuela PM, Matus MS, Araya GI, Paris E. Environmental pediatrics: an emerging issue. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87:89-99.
13. Wong GC, Berman BA, Hoang T, Bernaards C, Jones C, Bernert JT. Children's exposure to environmental tobacco smoke in the home: comparison of urine cotinine and parental reports. *Arch Environ Health*. 2002;57:584-90.
14. Wang X, Tager IB, Van Vunakis H, Speizer FE, Hanrahan JP. Maternal smoking during pregnancy, urine cotinine concentrations, and birth outcomes. A prospective cohort study. *Int J Epidemiol*. 1997;26:978-88.
15. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*. 1998;44:1309-15.
16. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2000;37:277-85.

17. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38:1103-11.
18. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37:112-9.
19. Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem.* 2004;52:7286-92.
20. Florescu A, Ferrence R, Einarson T, Selby P, Soldin O, Koren G. Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology. *Ther Drug Monit.* 2009;31:14-30.
21. Marano C, Schober SE, Brody DJ, Zhang C. Secondhand tobacco smoke exposure among children and adolescents: United States, 2003-2006. *Pediatrics.* 2009;124:1299-305.
22. Muscat JE, Kleinman W, Colosimo S, Muir A, Lazarus P, Park J, et al. Enhanced protein glutathion and oxidative stress in cigarette smoking. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:464-70.
23. Rahman I, MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1996;51:348-50.
24. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1173-81.
25. Cross CE, O'Neill CA, Reznick AZ, Hu ML, Marcocci L, Packer L, et al. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Ann NY Acad Sci.* 1993;686:72-89.
26. Bartal M. Health effects of tobacco use and exposure. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2001;56:545-54.
27. Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, Neveux LM, Chilmonczyk BA. Replacing creatinine measurements with specific gravity values to adjust urine cotinine concentrations. *Clin Chem.* 1994;40:562-4.
28. Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis.* 1997;18:1359-63.
29. Becker AB, Manfreda J, Ferfuson AC, Dimich-Ward H, Watson WT, Chan-Yeung M. Breast-feeding and environmental tobacco smoke exposure. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1999;153:689-91.

Correspondência:  
Ali Aycicek, MD  
Harran University Medical Faculty  
Pediatric Hematology Department  
63050 Sanliurfa - Turquia  
Tel.: +90 414 318 30 00-2156  
Fax: +90 414 315 11 81  
E-mail: ayciceka@hotmail.com