

Análise Citomorfométrica de Esfregaços Bucais de Fumantes Obtidos pela Citologia Esfoliativa em Base Líquida

Cytomorphometric Analysis of Oral Smears from Smokers Obtained by Liquid Base Exfoliative Cytology

Felipe Mussi FERREIRA^I
Adriana Bueno BATISTA^I
Sérgio Aparecido IGNÁCIO^{II}
Antonio Adilson Soares de LIMA^{III}

^IAcadêmicos do Curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba/PR, Brasil.

^{II}Professor Titular de Estatística do Curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba/PR, Brasil.

^{III}Professor Titular de Patologia do Curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Laboratório de Patologia Experimental, Curitiba/PR, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do uso de cigarro industrializado sobre as áreas nuclear (AN), citoplasmática (AC) e na relação núcleo/citoplasmática (AN/AC) de células epiteliais da mucosa bucal de adultos jovens.

Método: Esfregaços da mucosa jugal saudável foram obtidos pela técnica da citologia esfoliativa em base líquida de 58 indivíduos (28 indivíduos fumantes e 30 não fumantes). As lâminas foram processadas em laboratório, coradas pela técnica do Papanicolaou e analisadas utilizando um sistema analisador de imagens seguindo a metodologia preconizada por Ogden et al. (1990).

Resultados: A média da AN para os grupos experimental e controle foram, respectivamente, 1530,6 μm^2 e 1498,6 μm^2 . A variável AC apresentou as seguintes médias: 63780,3 μm^2 (experimental) e 62929,9 μm^2 (controle). A relação AN/AC para o grupo experimental foi de 0,023, enquanto que para o grupo controle foi de 0,024. O teste t de *student* demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa para as variáveis estudadas ($p > 0,05$).

Conclusão: O consumo de cigarro industrializado não foi capaz de induzir alterações morfológicas significativas nas células da mucosa bucal dos indivíduos estudados. Este fato reforça a hipótese de que há a necessidade de um tempo de exposição prolongada para que as modificações celulares ocorram.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of manufactured cigarettes on the nuclear area (NA), cytoplasmic area (CA), and nuclear/cytoplasmic ratio (NA/CA) in oral mucosa epithelial cells in young adults.

Method: Oral smears were collected by liquid-based exfoliative cytology from clinically healthy jugal mucosa in 58 individuals (28 smokers and 30 non-smokers). Glass slides were submitted to laboratory processing, stained by the Papanicolaou technique and analyzed using an image-analysis system, according to the methodology proposed by Ogden et al. (1990).

Results: The mean NA values for the experimental and control groups were 1530.6 μm^2 and 1498.6 μm^2 , respectively, while the mean CA values for the experimental and control groups were, respectively, 63780.3 μm^2 and 62929.9 μm^2 . The NA/CA ratio for the experimental group was 0.023 versus 0.024 for the control group. The Student's t-test showed no statistically significant difference for the studied variables ($p > 0.05$).

Conclusion: The consumption of manufactured cigarettes was not capable of inducing significant morphometric alterations in the oral epithelial cells of the individuals evaluated. This fact reinforces the hypothesis that long-term exposure to tobacco is needed before cellular alterations occur.

DESCRIPTORIOS

Tabagismo; Neoplasia bucal; Citologia; Mucosa bucal.

DESCRIPTORS

Smoking; Mouth neoplasia; Cytology; Mouth mucosa.

INTRODUÇÃO

O tabaco foi introduzido no mundo por Cristóvão Colombo que o descobriu entre as suas viagens ao Novo Mundo no ano de 1492. Mais tarde, os seguidores Colombo, os marinheiros portugueses e espanhóis o espalharam para todas as partes do Mundo no último século XV¹. Atualmente, é sabido que o consumo de tabaco pode resultar não apenas num grande número de diferentes problemas de saúde geral, tais como: carcinoma de pulmão, doenças cardíacas isquêmicas, doenças vasculares periféricas, choque, doenças pulmonares crônico-obstrutivas ou úlceras pépticas, mas também em várias lesões na mucosa bucal².

A prevalência de lesões bucais associadas ao tabagismo tem sido em torno de 4,1%. Várias entidades patológicas, tais como, estomatite nicotínica, fibrose submucosa, melanose do fumante, leucoplasia e o câncer bucal têm forte associação com o consumo de tabaco³.

O câncer bucal tem sua etiologia a partir de vários fatores, tais como os de natureza genética, virótica, física, química, etc⁴. O uso de tabaco em suas mais variadas formas pode funcionar tanto como agente iniciador como promotor do câncer, e pode ter sua ação acentuada por situações como o alcoolismo, desnutrição, ação de irritantes mecânicos e outras; é capaz de alterar o grau de ceratinização na mucosa bucal^{5,6} e, além disso, pode alterar a área nuclear das células de fumantes, que pode se elevar em relação à área nuclear celular de não fumantes^{7,8}. Os fumantes crônicos fazem parte de um grupo de alto risco que precisam ser orientados a serem submetidos periodicamente a exame bucal por cirurgiões-dentistas⁹.

Há evidências experimentais substanciais para o efeito carcinogênico do tabaco. Vários estudos celulares e em animais de laboratório vêm demonstrando que o tabagismo inicia e promove o desenvolvimento tumoral, especialmente, aqueles que acometem o trato gastrointestinal superior^{10,11}. A fumaça do cigarro contém várias classes de agentes carcinogênicos que incluem entre outros os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas e nitrosaminas. A fumaça do cigarro também possui altas concentrações de aldeídos tóxicos¹². O aldeído mais abundante na fumaça de cigarro é o acetaldeído, e sua concentração é cerca de mil vezes maior do que a dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e das nitrosaminas tabaco-específicas¹³.

Há 50 anos atrás, a citologia esfoliativa foi estabelecida como teste seguro e válido para as neoplasias malignas e displasias do sistema reprodutivo feminino, sendo, em seguida, adotado para o uso similar na boca. Entretanto, este exame ainda não demonstrou o mesmo grau de segurança para o diagnóstico das lesões bucofaríngeas¹⁴.

Recentemente, surgiu a citologia em base-líquida que é um novo método de preparo de amostras cervicais para exame citológico. Ao contrário da preparação do esfregaço convencional, este recurso envolve a suspensão de células das amostras, o que permite a produção de uma fina camada de células nas lâminas. Esta técnica apresenta algumas desvantagens no que se diz respeito aos equipamentos utilizados, pois envolve mais custos, tempo de preparação técnica, manutenção e transporte de líquidos¹⁵. Apesar de haverem incertezas quanto ao uso de citologia em base-líquida, em virtude do seu pouco tempo de utilização, sabe-se que esta técnica pode reduzir o número de erros nos resultados analisados, por possibilitar uma melhor leitura das lâminas, podendo diminuir o tempo de análise utilizado pelos patologistas¹⁶. Além disso, a técnica tem sido bem aceita, por ser capaz de providenciar preparações sem exsudatos inflamatórios e sangue o que facilita as análises. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a área nuclear (AN), a área citoplasmática (AC) e a relação AN/AC em esfregaços da mucosa bucal íntegra de indivíduos fumantes.

METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEP-PUCPR), Parecer no 240.

Foram selecionados indivíduos adultos usuários de cigarros (grupo experimental) e não-usuários (grupo controle). Foram considerados fumantes aqueles indivíduos que fumavam diariamente no mínimo uma carteira de cigarros do tipo industrializado. Inicialmente, os participantes foram orientados a realizar um enxágüe bucal com água para remover possíveis restos alimentares. A seguir, uma amostra de células epiteliais fora obtida da mucosa jugal clinicamente saudável pela técnica da Citologia esfoliativa em base líquida. A coleta de células foi realizada com um kit denominado UCM (Universal Collection Medium do Sistema DNA-CITOLIQ®, Brasil). O material foi processado em laboratório seguindo as especificações do fabricante, disposto sobre lâminas de vidro e fixado pela imersão em uma solução de álcool etílico absoluto por 20 minutos. A seguir, procedeu-se a coloração das mesmas com a técnica de coloração do Papanicolaou e a análise citomorfométrica.

A análise dos esfregaços foi realizada por meio da microscopia de luz utilizando um microscópio binocular, modelo Olympus BX50 (Olympus, Japan) adaptado com ocular WH 10X-H/22 (Olympus, Japan) e objetivas PLAN 40X/0,25 (Olympus, Japan). Previamente a leitura, as lâminas tiveram seus números de identificação cobertos para evitar viés. Cinquenta células foram examinadas aleatoriamente por um único examinador de acordo com a

metodologia preconizada por Ogden et al.⁷. As áreas nucleares (AN) e citoplasmáticas (AC) foram obtidas pela delimitação dos limites do núcleo e do citoplasma da célula, usando-se o cursor digitador e a placa no modo de medida. A imagem dos campos citológicos foi capturada em uma ampliação de 400 vezes, por uma câmera Sony CCD Iris Color Video Camera (Sony Model DXC-107A, Japan) e a avaliação das células foi feita por meio do sistema de análise de imagens Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA), versão 4.5.029 for Windows 98/NR/2000.

Os valores obtidos para cada variável foram registrados e tabulados em planilhas do software Excel for Windows. Foram utilizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, homogeneidade de Levene e o teste t de Student.

RESULTADOS

Vinte e oito indivíduos fumantes com idade média 20,8 anos fizeram parte do grupo experimental (fumantes) e outros trinta indivíduos não-fumantes com idade média de 21 anos participaram do grupo controle. Entre os indivíduos do sexo feminino, 19 eram fumantes e 18 não fumantes. Já para o sexo masculino, nove indivíduos eram fumantes e 12 não fumantes. A média de cigarros consumidos pelos indivíduos do grupo experimental foi de 21,6 cigarros/dia e do tempo de consumo foi de 27,5 anos.

As variáveis AN, AC e AN/AC foram avaliadas num total de 2900 células epiteliais. Os valores da média e do desvio-padrão para as variáveis AN, AC e AN/AC são exibidos na Tabela 1. Os resultados revelaram que a média da AN foi menor para o grupo experimental quando comparada à média do grupo controle. A média da AC também se apresentou maior no grupo experimental do que no grupo controle. A relação AN/AC foi menor no grupo experimental se comparada à média do grupo controle. Os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e de homogeneidade de variância de Levene revelaram que os dados apresentaram uma distribuição normal e variâncias homogêneas entre os grupos ($p > 0,05$). O teste t de Student demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa para as variáveis AN, AC e a relação AN/AC entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 1. Média da AN, AC e AN/AC para indivíduos fumantes e não-fumantes.

Variável	Grupos		Valor p
	Fumantes	Não fumantes	
AN	Média ± desvio-padrão 57,81µm ² ± 12,06	Média ± desvio-padrão 58,26µm ² ± 11,14	0,563537302
AC	Média ± desvio-padrão 1733,74µm ² ± 442,55	Média ± desvio-padrão 1755,81µm ² ± 308,46	0,346509703
AN/AC	Média ± desvio-padrão 0,04 ± 0,01	Média ± desvio-padrão 0,04 ± 0,01	0,882600553

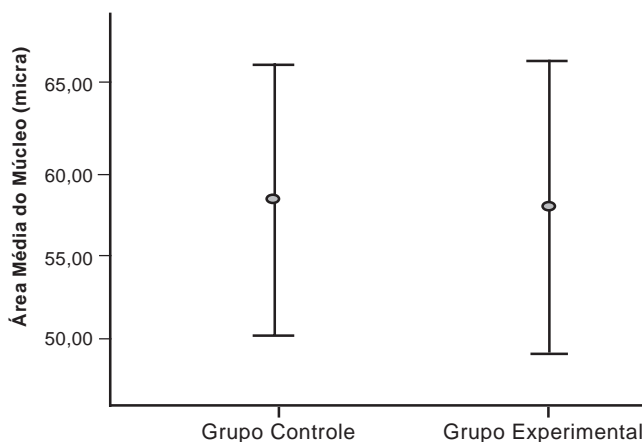


Figura 1. Intervalo de confiança (95%) para o valor médio da área do núcleo segundo o tabagismo.

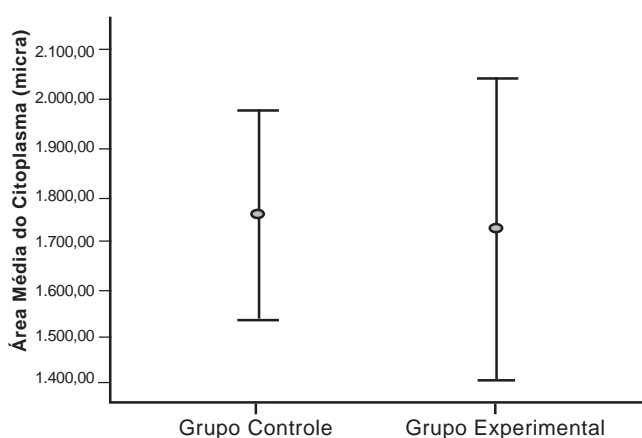


Figura 2. Intervalo de confiança (95%) para o valor médio da área do citoplasma segundo o tabagismo.

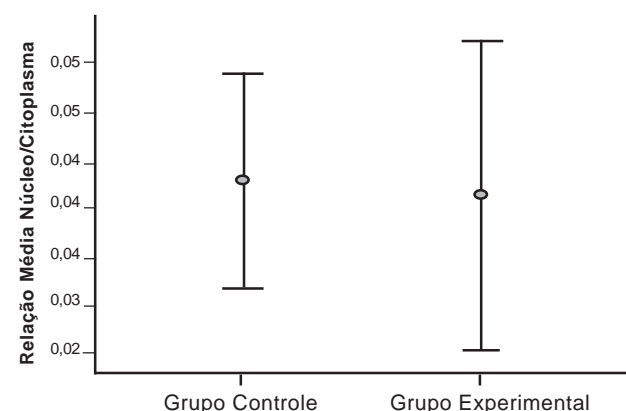


Figura 3. Intervalo de confiança (95%) para o valor médio da relação AN/AC segundo o tabagismo.

DISCUSSÃO

Desde que a citologia esfoliativa em base líquida foi desenvolvida no ano de 1990, vários estudos comparativos têm demonstrado que esta técnica nova pode oferecer vantagens significativas sobre a citologia esfoliativa convencional¹⁷⁻¹⁹. Até o presente momento, não

há na literatura nenhum estudo que avaliou os efeitos do tabagismo sobre a mucosa bucal de indivíduos fumantes utilizando esta técnica.

As lâminas obtidas a partir da citologia esfoliativa em base líquida revelaram um ganho na qualidade dos esfregaços, bem como, houve uma melhoria na avaliação citomorfológica de doenças, tais como: pênfigo vulgar, carcinoma espinocelular, infecções fúngicas e lesões produzidas pelo HPV²⁰. A citologia esfoliativa é um recurso capaz de identificar alterações malignas por meio do cálculo da relação núcleo/citoplasma usando método da planimetria em esfregaços corados pela coloração do Papanicolaou²¹. Uma área nuclear reduzida e uma área citoplasmática aumentada são fortes indicadores precoces da transformação maligna¹⁸. A partir deste conhecimento, um grande número de estudos foi realizado usando esta técnica descrita para avaliar a influência de diversos fatores sistêmicos e externos sobre as áreas nuclear e citoplasmática e a relação núcleo/citoplasma²².

Vários fatores de risco vêm sendo apontados com relação ao desenvolvimento do câncer bucal. Entre eles, se destaca o tabagismo que tem sido implicado como o principal fator de risco na etiologia para o câncer bucal em qualquer idade e outras lesões envolvendo a mucosa bucal²³. Atualmente, sabe-se que a quantidade de cigarros industrializados consumidos por um indivíduo se reflete diretamente numa maior probabilidade de desenvolvimento do câncer bucal²⁴. Este estudo teve por objetivo avaliar se alterações significativas poderiam ser identificadas por meio da planimetria em esfregaços colhidos pela citologia em base líquida da mucosa bucal clinicamente saudável de indivíduos usuários de tabaco sob a forma de cigarros industrializados.

O efeito do uso contínuo de derivados de tabaco sobre as áreas do núcleo e do citoplasma ainda gera muita controversa. Hillman et al.²⁵ observaram um aumento representativo nestas duas variáveis em fumantes portadores de carcinoma bucal. Posteriormente, Ogden et al.⁷ demonstraram que ocorre um aumento significativo na área nuclear de células de fumantes e nenhuma alteração na área do citoplasma. Mais recentemente, Pavanello et al.²⁶ não encontraram alterações morfológicas significativas em esfregaços de jovens fumantes, mas, acreditam que mesmo após um curto período de uso de cigarros industrializados associado ao consumo de bebidas alcoólicas, a mucosa bucal exibe alterações de natureza inflamatória. Estudos realizados em modelos animais e humanos demonstraram que o dano oxidativo e induzido pelos nitratos ao DNA acontecem em áreas de carcinogênese sem levar em conta o fator etiológico. Entretanto, já é sabido que quantidades excessivas de espécies de nitrogênio reativo produzidas durante a inflamação crônica podem desempenhar um papel importante na carcinogênese devido a danos ao DNA²⁷.

Na Índia, o vício de mascar betel associado ou

não com tabaco é capaz de gerar uma redução significativa na área do citoplasma e um aumento na área do núcleo de células da mucosa bucal^{8,22}. O uso do betel é comum em países orientais e tem se mostrado capaz de provocar o câncer bucal. Entretanto, este vício não é observado aqui no Brasil.

Os resultados encontrados no presente estudo não revelaram alterações morfológicas significativas nas áreas do núcleo e do citoplasma e na relação entre estas. Embora, os valores da área do núcleo e da área do citoplasma tenham diminuído nos esfregaços do grupo de fumantes. Esta diferença observada quando comparada aos estudos anteriormente realizados pode ser devido, em parte, as diferenças nas metodologias empregadas.

Vários estudos usaram a citologia esfoliativa convencional^{7,8,25}. Muito provavelmente, a melhoria na qualidade dos esfregaços obtidos pela citologia em base líquida associada ao uso dos sistemas analisadores de imagens computadorizados tenha contribuído para estes achados. Além da diferença no método empregado, outro fato poderia justificar os resultados encontrados. A maioria dos esfregaços analisados neste estudo foi obtida de indivíduos abaixo dos 25 anos de idade, o que pode ter influenciado nos resultados das variáveis estudadas. Se um número maior de esfregaços de indivíduos fumantes numa faixa etária mais elevada tivesse sido avaliado, provavelmente, o resultado obtido no presente estudo teria sido diferente. Este fato reforça a necessidade da realização de mais estudos usando a técnica da citologia esfoliativa em base líquida em indivíduos com a idade mais avançada e com um tempo de consumo maior de cigarros.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aldeídos, amins aromáticas, nitrosaminas e outros componentes do tabaco são reconhecidos como possíveis agentes carcinogênicos²⁸. Em animais de laboratório, se sabe que o tabaco é capaz de induzir hiperortoceratose, acantose, numerosas células epiteliais binucleadas e a hialinização do tecido conjuntivo subepitelial²⁹. A mucosa bucal humana parece ser mais susceptível a ação dos agentes carcinogênicos da fumaça dos cigarros. Este efeito foi observado em esfregaços citológicos que exibiram um aumento da atividade da proliferação celular³⁰. O mecanismo pelo qual o tabaco é capaz de produzir lesão às células epiteliais da mucosa bucal acontece pela geração de radicais livres e, assim, causando danos oxidativos às estruturas lipídicas, protéicas e aos ácidos nucléicos³¹.

Apesar dos resultados deste estudo não demonstrarem alterações citomorfométricas importantes é fundamental reforçar que o exame sistemático da mucosa bucal e o uso da citologia esfoliativa em base líquida deve ser parte integral de todos os exames odontológicos de rotina, principalmente, naqueles indivíduos envolvidos com os fatores de risco para lesões bucais. Mesmo porque, se sabe que grande parte da população desconhece o fato do

tabagismo representar um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de boca, principalmente, os indivíduos mais jovens que se tornam vulneráveis a experimentar e a consumir cigarros industrializados^{32,33}.

CONCLUSÃO

Este estudo revelou que o consumo de cigarro industrializado não foi capaz de induzir alterações morfológicas significativas nas células da mucosa bucal de indivíduos jovens. Este fato reforça a hipótese de que há a necessidade de um tempo de exposição prolongada para que as modificações celulares ocorram.

REFERÊNCIAS

- Chaly PE. Tobacco control in India. *Indian J Dent Res* 2007; 18(1):2-5.
- Bornstein MM, Klingler K, Saxer UP, Walter C, Ramseier CA. Tobacco-associated lesions of the oral mucosa. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2006; 116(12):1261-74.
- Saraswathi TR, Ranganathan K, Shanmugam S, Sowmya R, Narasimhan PD, Gunaseelan R. Prevalence of oral lesions in relation to habits: Cross-sectional study in South India. *Indian J Dent Res* 2006; 17(3):121-5.
- Bsoul AS, Huber MA, Terezhalmi GT. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: A comprehensive review for health providers. *J Contemp Dental Pract* 2005; 6(4):1-16.
- Mosadomi A, Shklar G, Loftus ER, Chauncey HH. Effects of tobacco smoking and age on the keratinization of palatal mucosa: a cytologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46(3):413-7.
- Gangane N, Chawla S, Subodh A, Gupta S, Sharma SM. Reassessment of risk factors for oral cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007; 8(2):243-8.
- Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990; 19(2):53-5.
- Einstein TB, Sivapathasundharam B. Cytomorphometric analysis of the buccal mucosa of tobacco users. *Indian J Dent Res* 2005; 16(2):42-6.
- Ling H, Gadalla S, Israel E, Langenberg P, Zhan M, Dwyer DM, Groves C, Hopkins A, Steinberger EK. Oral cancer exams among cigarette smokers in Maryland. *Cancer Detect Prev* 2006; 30(6):499-506.
- Lee HJ, Guo HY, Lee SK, Jeon BH, Jun CD, Lee SK, Park MH, Kim EC. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(7):436-43.
- Patel BP, Rawal UM, Shah PM, Prajapati JA, Rawal RM, Dave TK et al. Study of tobacco habits and alterations in enzymatic antioxidant system in oral cancer. *Oncology* 2005; 68(4-6):511-9.
- Hoffmann D, Hecht S. Advances in tobacco carcinogenesis. In: Cooper CS, Grover P. *Handbook of experimental pharmacology*. Heidelberg: Springer Verlag, 1990, p. 63-102.
- Hoffmann D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 1997; 50(4):307-64.
- Kahn MA. Oral exfoliative cytology procedures: Conventional, Brush biopsy and ThinPrep. *J Tenn Dent Assoc* 2001; 81(1):17-20.
- Herbert A, Johnson J. Personal view. Is it reality or an illusion that liquid-based cytology is better than conventional cervical smears? *Cytopathology* 2001; 12(6):383-9.
- Payne N, Chilcot J, McGoogan E. Liquid-based cytology for cervical screening. *Cytopathol* 2000; 11(6):469-70.
- Sandrin R. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Análise comparativa entre a citologia esfoliativa em base-líquida e a citologia esfoliativa convencional no diagnóstico de candidose bucal. [Dissertação]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2003.
- Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 2006; 5:1-9.
- Campagnoli EB. Comparação entre a citologia em base-líquida e a citologia convencional no diagnóstico de carcinomas bucais. [Dissertação]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2003.
- Hayama FH, Motta AC, Silva AP, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10(2):115-22.
- Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal oral squames: An age, site and sex related survey. *J R Soc Med* 1985; 78(12):995-1004.
- Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27(2):83-6.
- Iype EM, Pandey M, Mathew A, Thomas G, Nair MK. Squamous cell cancer of the buccal mucosa in young adults. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004; 42(3):185-9.
- Doll R, Peto R, Borehan J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years observation on male British doctors. *BMJ* 2004; 328(7455):1519.

Visite o web site da Revista Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada e acesse gratuitamente os artigos.

<http://www.uepb.edu.br/eduep/pboci>.



25. Hillman RW, Kissin B. Oral cytologic patterns in relation to smoking habits. Some epithelial, microfloral, and leukocytic characteristics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42(3):366-74.
26. Pavanello LB, Prado FA, Balducci I, Brandao AA, Almeida JD. Cytologic analysis of alterations induced by smoking and by alcohol consumption. *Acta Cytol* 2006; 50(4):435-40.
27. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem* 2006; 387(4):365-72.
28. Majumder M, Sikdar N, Paul RR, Roy B. Increased risk of oral leukoplakia and cancer among mixed tobacco users carrying XRCC1 variant haplotypes and cancer among smokers carrying two risk genotypes: one on each of two loci, GSTM3 and XRCC1 (Codon 280). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(9):2106-12.
29. Chen SY. Effects of smokeless tobacco on the buccal mucosa of HMT rats. *J Oral Pathol Med* 1989; 18(2):108-12.
30. Cançado RP, Yurgel LS, Sant'Anna Filho M. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol* 2001; 37(5):446-54.
31. Pereira FEL. Etiopatogênese geral das lesões. In: Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia geral*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. p. 22-43.
32. Lima AAS, França BHS, Ignácio AS, Baioni CS. Conhecimento de alunos universitários sobre câncer bucal. *Rev Bras Cancerol* 2005; 51(4):283-8.
33. Lowry RJ, Craven MA. Smokers and drinkers awareness of oral cancer: a qualitative study using focus groups. *Brit Dent J* 1999; 187(12):668-70.

Recebido/Received: 18/04/07

Revisado/Reviewed: 22/08/07

Aprovado/Approved: 10/09/07

Correspondência/Correspondence:

Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima

Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR

Avenida Imaculada Conceição 1155 - Prado Velho

Curitiba/PR, Brasil

CEP: 80215-901

Telefone: (41) 3271-1637

Fax: (41) 3271-1405

E-mail: a.lima@pucpr.br