

LESLIE CLIFFORD NORONHA ARAUJO

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO CÓLO
VESICAL DE FUMANTES SUBMETIDOS À
PROSTATECTOMIA RADICAL**

**Recife
2013**

LESLIE CLIFFORD NORONHA ARAUJO

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO CÓLO
VESICAL DE FUMANTES SUBMETIDOS À
PROSTATECTOMIA RADICAL**

Dissertação apresentada ao
Programa de
Pós-Graduação em Cirurgia da
Universidade do Federal de
Pernambuco,
como requisito final para a obtenção
do
grau de Mestre.

Orientador: Dr. Salvador Vilar Correia Lima Ph.D

**Recife, PE – Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 - 1010

A663a Araújo, Leslie Clifford Noronha.
 Alterações morfológicas do cólo vesical de fumantes submetidos à
 prostatectomia radical / Leslie Clifford Noronha Araujo. – Recife: O autor,
 2013.
 73 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

 Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, 2013.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Tabagismo. 2. Obstrução do colo da bexiga urinária. 3. Tecido
 elástico. I. Lima, Salvador Vilar Correia (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-202)

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO CÓLO VESICAL DE FUMANTES
SUBMETIDOS À PROSTATECTOMIA RADICAL**

LESLIE CLIFFORD NORONHA ARAUJO

APROVADO EM: 28/11/2013

ORIENTADOR INTERNO: **DRº. SALVADOR VILAR CORREIA LIMA**

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROFº - JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR (PRESIDENTE) – CCS - UFPE

PROFº DRº. JOSEMBERG MARINS CAMPOS – CCS/UFPE

PROFº DRº. WALDEMAR SILVA COSTA -UERJ

Aos meus pais **José Mauro Leite Araujo** e **Frances Noronha Araujo**, incentivadores em todos os momentos de minha vida.

À minha esposa, **Flávia Cristina Morone Pinto**.

Aos meus filhos, **Guilherme Morone Araujo** e **Isabela Morone Araujo**, por serem vocês mesmos.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a realização deste trabalho, nem todas podemos citar, mas gostaria de agradecer à todos aqueles que de alguma forma participam do dia a dia de trabalho do Laboratório de Pesquisa Urogenital – FCM - UERJ, seja aluno, técnico ou professor, mas em especial ao Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio e ao Prof. Dr. Waldemar Silva Costa, pela paciência, compreensão, dedicação e pela oportunidade em ajudar à conquistar um sonho de vida.

Agradeço, ainda, aos professores Salvador Vilar Correia Lima, Fábio de Oliveira Vilar, bem como os demais professores do programa de mestrado em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, pela receptividade, compreensão e conselhos essenciais para o resultado final desta obra.

À todos muito obrigado.

RESUMO

O tabagismo é um importante fator de risco para diversas patologias, afetando o sistema arterial, pele e sistema urogenital onde inclui a estenose do colo vesical, seu efeito no colo vesical ainda não foi descrito. Avaliar possíveis alterações morfológicas ocasionadas pela nicotina no colo vesical. Foram avaliados estereologicamente fragmentos do colo vesical de 16 paciente divididos em dois grupos, um tabagista e um não tabagista com respectivamente, 7 e 9 pacientes, após 90 dias da cirurgia foram submetidos a urofluxometria livre e tendo dados analisados por teste T não pareado, obtendo significância estatística com $p < 0,05$. Foram observados aumento de 63,26% na quantidade de fibras do sistema elástico no grupo tabagista e diminuição da espessura das artérias em 35,96%, bem como aumento do IPSS e queda do fluxo máximo à urofluxometria todos com significância estatística. As alterações laboratoriais são semelhantes às encontradas em outros trabalhos em diferentes tipos de tecidos, tais como a pele, onde estes achados estão relacionados ao envelhecimento precoce. Os resultados clínicos, embora estatisticamente significativos, não possuem consistência clínica devido ao desenho do estudo ter sido para análise morfológica. O tabagismo aumenta a quantidade de fibras do sistema elástico e diminui a espessura das artérias do colo vesical.

Palavras chave: Tabagismo. Obstrução do Colo da Bexiga Urinária. Tecido Elástico

ABSTRACT

Smoking is an important risk factor to many diseases, affecting arterial system, skin and urogenital system, including bladder neck stenosis. Its effect on bladder neck has not been described. Evaluate possible morphological changes caused by nicotine in the bladder neck. Fragments of bladder neck of 16 patients were submitted to stereological analysis, divided in two groups, one of smokers and the other of non-smokers with 7 and 9 patients, respectively. After 90 days of surgery they were submitted to free uroflowmetry and data analyzed by T test, having statistical significance with $p < 0,05$. An increase of 63.26% in the amount of fibers in the elastic system of the smokers group was observed, a reduction of 35.96% in the thickness of arteries, as well as increase of IPSS and decrease of maximum flow in uroflowmetry, all with statistical significance. Laboratorial changes are similar to those found in other studies with different tissues, such as skin, in which those findings are related to premature ageing. Clinical results, though statistically significant, do not have clinical consistence because the study was meant to morphological analysis. Smoking increases the amount of fibers in the elastic system and decreases the thickness of bladder neck arteries.

Key Word: Smoking. Urinary Bladder Neck Obstruction. Elastic Tissue

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

	PÁGINA
Tab1. Média e Desvio Padrão da Análise Estereológica	49
Tab2. Análise de Variância (ANOVA) e Teste T	50
Tab3. Análise de Correlação de Pearson e Regressão Linear	51
Gráfico1. Quantidade de fibras do sistema elástico, comparação entre grupos.	52
Gráfico2. Comparação do IPSS entre os grupos.	52
Gráfico3. Urofluxometria. Fluxo Máximo, comparação entre os grupos.	52
Gráfico4. Altura da parede arterial. Comparação entre os grupos	52
Gráfico5. Correlação de Pearson Q _{máx} e Fibras do Sistema Elástico	53
Gráfico6. Correlação de Pearson IPSS e Fibras do Sistema Elástico	53
Gráfico7. Correlação de Pearson espessura da parede arterial e Fibras do Sistema Elástico.	53

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Fig1. Corte sagital demonstrando relações entre as vísceras pélvicas.	17
Fig2. Junção uretero-vesical normal. A, secção da parede vesical perpendicular ao ureter demonstrando a inserção oblíqua. B, continuação do uretér com fixação no trígono vesical e fixação no colículo prostático.	18
Fig3. Local de dissecção do ápice prostático e abertura da uretra.	30
Fig4. Anastomose vesico-uretral com pontos separados.	31
Fig5. Fluxometria Livre Normal e com Baixo Fluxo.	36
Fig6. Gráfico Urofluxometria.	36
Fig7. IPSS em Português.	38
Fig8. Fotomicrografia – Resorcina-Fucsina de Wiegert – tabagista 400x	48
Fig9. Fotomicrografia – Resorcina-Fucsina de Wiegert – não-tabagista 400x.	48
Fig10. Parede vascular tabagista- Van Gieson – 1000x	48
Fig11. Parede vascular não-tabagista – H&E – 1000x	48
Fig12. Urofluxometria livre não tabagista	49
Fig13. Urofluxometria livre tabagista	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

NO – Óxido nítrico

RNA - Ácido Ribonucléico

PSA – Antígeno Prostático Específico

ECV – Esclerose do Colo Vesical Pós Prostatectomia

Radical

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DAC – Doença Arterial Coronariana

DM – Diabetes Mellitus

RTUP – Ressecção Trasuretral da Próstata

Qmax – Fluxo Máximo à Urofluxometria Livre

LUTS – Lower Urinary Tract Symptoms

IPSS – International Prostate Score Symptoms

H&E – Hematoxilina e Eosina

MD – Média

DP – Desvio Padrão

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO	13
1.1 TABAGISMO	13
1.1.1 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OCASIONADAS PELO CONSUMO DO TABACO	14
1.2 ANATOMIA DA BEXIGA	16
1.2.1 A ESTRUTURA DA BEXIGA	19
1.2.1.1 A MATRIZ EXTRA-CELULAR	21
1.2.2 A CIRCULAÇÃO DA BEXIGA	23
1.2.3 A INERVAÇÃO DA BEXIGA	24
1.3 A ANATOMIA DA PRÓSTATA	25
1.4 O CÂNCER DE PRÓSTATA	27
1.5 A PROSTATECTOMIA RADICAL	29
1.6 AS COMPLICAÇÕES DA PROSTATECTOMIA RADICAL	32
1.6.1 A INCONTINÊNCIA URINÁRIA	32
1.6.2 A DISFUNÇÃO ERÉTIL	33
1.6.3 A ESCLEROSE DA ANASTOMOSE COLOVESICAL	33
1.7 A UROFLUXOMETRIA LIVRE	35
1.8 O IPSS (INTERNATIONAL PROSTATE SCORE SYMPTOMS)	37
1.9 JUSTIFICATIVA PARA A INVESTIGAÇÃO	39
2 – OBJETIVO	40
3- MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 – SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	41

3.2 – SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS	41
3.3 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E COLORAÇÃO	43
3.3.1 – HISTOQUÍMICA	43
3.4 – AQUISIÇÃO DAS IMAGENS	44
3.5 – ESTEREOLOGIA	44
3.6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4 - RESULTADOS	47
5 – DISCUSSÃO	54
6 - CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	
ANEXO I –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	65
ANEXO II – ARTIGO PUBLICADO	69

1. INTRODUÇÃO

Realizada revisão de literatura envolvendo os efeitos do tabagismo em diversos tecidos

1.1TABAGISMO

O tabagismo está relacionado como um importante fator de risco para diversas patologias sejam elas neoplásicas ou não, no trato urogenital são o câncer de bexiga e próstata, disfunção erétil, esclerose de colo vesical pós prostatectomia radical, dentre outras[3-10].

Alguns autores sugerem que ocorram alterações vasculares, principalmente endoteliais em decorrência do consumo crônico de nicotina[11-13], causando injúria do tecido, formação de ions superóxidos, reduzindo a produção e disponibilidade de Óxido Nítrico, aumentando a produção de endotelina, levando à disfunção endotelial, trombose, aterosclerose e outras patologias [12].

1.1.1 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OCASIONADAS PELO CONSUMO DO TABACO

Além das patologias oncológicas relacionadas ao consumo da nicotina, existem alterações específicas na morfologia de vários tecidos, tais como pele, sistema cardiovascular e respiratório.

No sistema respiratório, o cigarro está relacionado a um processo inflamatório crônico, com indução de resposta inflamatória e DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) [14-17], estando intimamente associado a indução das metaloproteinases da matrix extra-celular [18], ocasionando o depósito de colágeno tipos I e III, e posteriormente com metaplasia escamosa. É importante salientar que o depósito é realizado por colágeno sintetizado por metaloproteinases induzidas pela exposição direta ao tabaco, possuindo alterações em sua quantidade e morfologia, além de sofrerem influência da imunorreatividade dos fatores de crescimento, também alterados em decorrência da nicotina [19].

No sistema cardiovascular o consumo do cigarro está associado a um aumento do risco de doença arterial periférica [20], hipertensão, infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares encefálicos, tendo como meio principal a ativação dos receptores centrais e periféricos do sistema autônomo, estando associada a uma redução da ativação do óxido nítrico (NO), que altera a reatividade endotelial, ocasionando alterações na resistência das arteríolas, complacência, alterações na musculatura lisa e nos canais de iônicos [7].

Outra alteração importante do tabaco é o aumento da rigidez arterial, que compromete a elasticidade e conseqüentemente sua função. Alguns autores descrevem a relação desta alteração com a ativação das

metaloproteinases, e associada a ativação de fatores de crescimento [21-23]. Esta alteração relacionada à metaloproteinases, ocasiona a desorganização das fibras do sistema elástico, calcificação e rigidez vascular, além de uma disfunção vasomotora arterial, vista em paciente com doença renal crônica em regime dialítico [24].

Na pele o tabaco é um fator de risco independente para aumento da quantidade de fibras do sistema elástico na derme nos seus dois principais componentes, a elastina e microfibrilar. Este aumento não ocorre devido à produção de novas fibras, mas ocorre devido à sua degradação, assim como ocorre na exposição solar [25].

Provavelmente esta degradação das fibras do sistema elástico ocorre pelo aumento local das metaloproteinases, levando a um desequilíbrio entre a produção e degradação dos componentes das fibras do sistema elástico que está diretamente relacionado com o envelhecimento precoce [26-28].

1.2 ANATOMIA DA BEXIGA

A bexiga é uma víscera pélvica, impar, localizada anteriormente ao reto, nas mulheres á posterior ao útero e nos homens à sínfise púbica.

Possui a capacidade média de 500ml, assumindo um formato ovóide. Quando vazia possui forma tetraédrica, podendo identificar uma parede superior, com o ápice no úraco, duas faces latero-posteriores, e a base, que possui o colo vesical como ponto mais distal da bexiga.

O úraco ancora a bexiga na parede abdominal anterior. O ponto vesical de inserção do úraco predispõe a formação de divertículos devido a frágil parede muscular. O úraco é composto de uma musculatura lisa em formação longitudinal derivado da parede vesical. Próximo ao umbigo se torna fibroso, muitas vezes fundindo-se com a artéria umbilical obliterada. As veias do úraco correm longitudinalmente. Um epitélio luminal frequentemente persiste durante a vida e é a possível sede do adenocarcinoma de úraco, que é incomum.

Em casos raros a continuidade luminal do úraco pode ser fonte de infecções bacterianas ou fístulas urinárias.

A face superior á recoberta pelo peritônio, que anteriormente forma o fundo de saco anterior recobrimdo a parede abdominal anterior. Com a bexiga apresenta distensão em sua plenitude, exteriorizando-se da pelve verdadeira, a afasta o peritônio da face abdominal anterior, o que justifica a possibilidade da realização de cistostomia por punção sem perfuração da cavidade peritoneal. Posteriormente o peritônio passa ao nível das vesículas seminais para encontrar outro folheto peritoneal na face retal anterior, no espaço retovesical.

Anteroinferiormente e lareralmente, a fixada à parede pélvica lateral pela gordura retropúbica e perivesical e por um tecido conjuntivo frouxo. Este espaço em particular (espaço de Retzius), que dividi-se anteriormente na fáscia

transversalis e permite o acesso às vísceras pélvicas e posteriormente aos vasos ilíacos e ureteres. A base da bexiga, no homem, relaciona-se com as vesículas seminais, ureteres terminais e ductos deferentes (fig1).

Abrem-se na bexiga os meatos ureterais bilateralmente, separados pela barra inter-ureteral. Limitam em conjunto com o colo vesical uma região denominada trígono vesical.

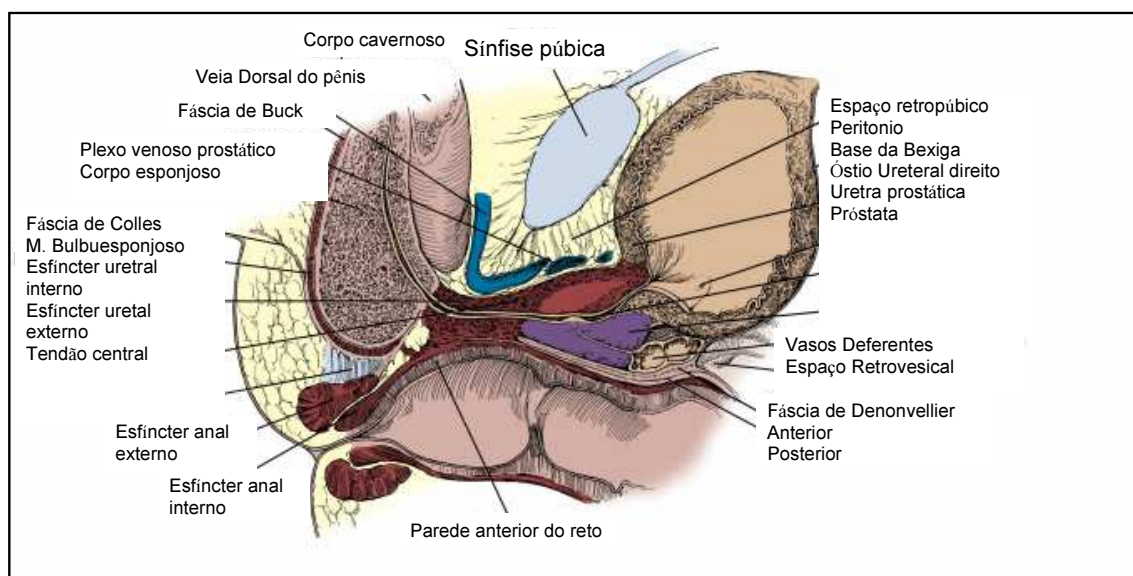


Fig 1. Corte sagital demonstrando relações entre as vísceras pélvicas (Hinman, f Jr, Atlas of Urosurgical Anatomy. Philadelphia, WB Saunders, 1993, p356)

O colo vesical esta localizado à 3 a 4 cm abaixo de sínfise púbica. É o local onde encontra-se o meato uretral interno firmemente fixado pela fáscia pélvica, e possui continuidade com a próstata nos homens (fig2). Nas mulheres a presença do útero e da elevação com músculo levantador do ânus pela vagina anterior, o colo vesical e elevado e retraído durante a contração do diafragma pélvico.

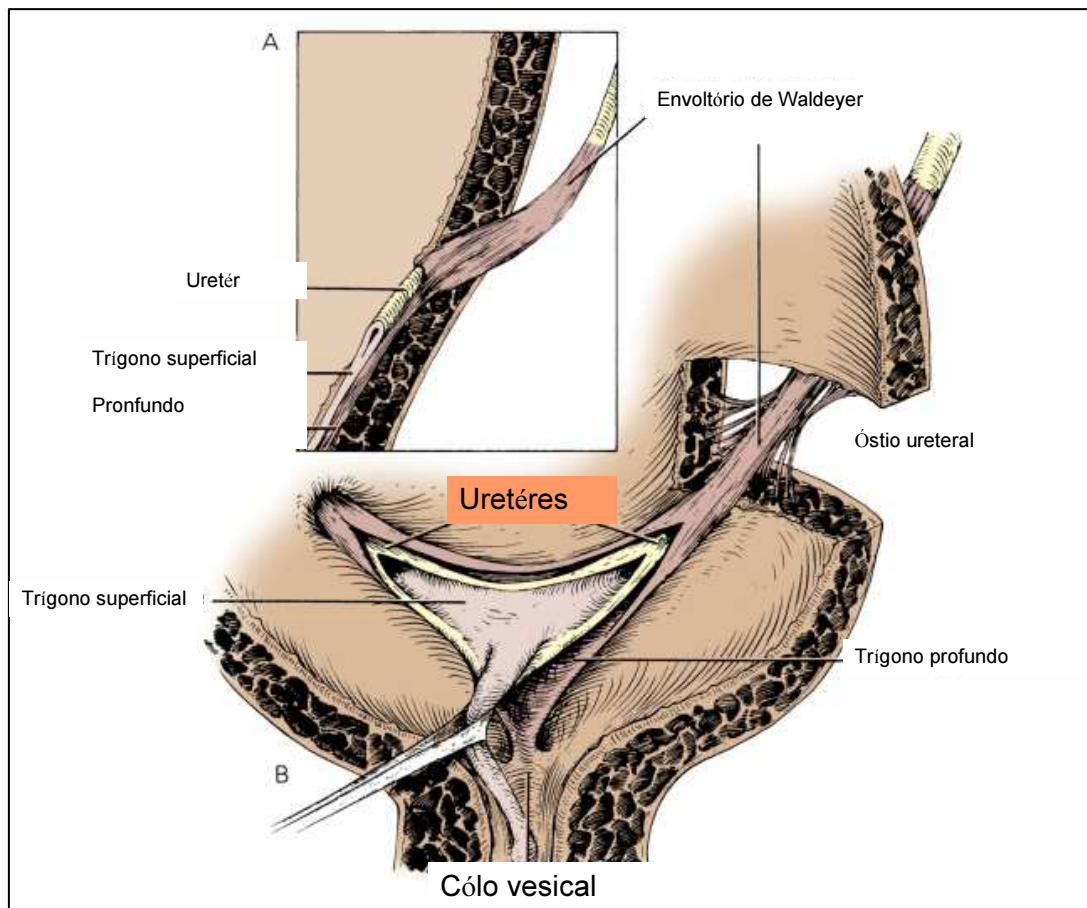


Fig 2. Junção uretero-vesical normal. A, secção da parede vesical perpendicular ao ureter demonstrando a inserção oblíqua. Pinçado em. B, continuação do uretér com fixação no trígono vesical e fixação no colículo prostático (Tanagho EA, Pugh RC: The anatomy and function of the ureterovesical junction. Br J Urol, 1963; 35: 151-156)

1.2.1 A ESTRUTURA DA BEXIGA

A superfície interna da bexiga é recoberta pelo epitélio de transição, que aparece como uma fina camada quando a bexiga está cheia e um epitélio com aproximadamente 6 camadas em uma fina camada basal quando a bexiga está vazia. Abaixo do urotélio observa-se a lâmina própria formada de um leito relativamente espesso de tecido conjuntivo fibro-elástico, e que possui uma distensão considerável. Esta camada contém diversos vasos sanguíneos, e fibras musculares lisas formando a muscular da mucosa. Logo abaixo desta camada apresenta-se a camada muscular da bexiga que dividi-se em três: longitudinal interna, circular média e longitudinal externa. Esta conformação da musculatura vesical encontra-se bem evidente quando se aproxima do colo vesical do que no ápice da bexiga, onde estas camadas de fibras parecem se fundir, tornando menos evidente a disposição muscular em camadas.

Próximo ao colo vesical, a musculatura lisa é morfológica e farmacologicamente diferente do restante da bexiga, as fibras musculares de grande diâmetro dão lugar à fibras mais finas. A estrutura do colo vesical parece ser diferente em homens e mulheres. Nos homens, a estrutura muscular interna do colo vesical possui continuidade com a camada muscular interna da uretra prostática (fig2).

A camada média possui disposição circular, formando um esfíncter pré-prostático e é responsável pela continência ao nível do colo vesical, Esta camada muscular é inervada abundantemente por fibras adrenérgicas, que proporcionam o fechamento do colo vesical. A lesão da inervação simpática vesical, como resultado do diabetes mellitus ou devido à linfadenectomia retroperitoneal, pode causar ejaculação retrógrada.

A camada longitudinal externa é fixada posteriormente à base da bexiga, e em sua fixação medial. Lateralmente suas fibras correm em direção posterior envolvendo o colo vesical, participando também da continência. Nas faces lateral e anterior, as fibras longitudinais não são bem desenvolvidas. Algumas fibras anteriores podem unir-se ao ligamento puboprostático. Estas fibras, devido à sua natureza muscular, devem participar na abertura do colo vesical durante a micção.

Nas mulheres a camada interna é semelhante à dos homens, mas a média não é tão robusta quanto a masculina, sendo que alguns autores descrevem esta camada como ausente. A camada externa une-se à camada interna, formando um leito único muscular. A grande diferenciação do colo vesical feminino e masculino é a inervação adrenérgica.

O trígono vesical é definido como a região da base da bexiga onde se encontra uma camada de urotélio entre os dois orifícios ureterais e o meato uretral interno. Uma fina camada muscular longitudinal atravessa a base da bexiga entre os dois orifícios ureterais.

O músculo do trígono se divide em três camadas, uma camada superficial, que é derivada da musculatura do uretér, que se estende pela uretra prostática até o colículo prostático, a segunda é uma camada fibromuscular que se insere no colo vesical e uma terceira camada que é a camada detrusora, formada pela camada longitudinal externa e circular média da musculatura da parede vesical.

O urotélio que recobre o trígono vesical é normalmente composto de uma camada de três células, fortemente aderida ao músculo por uma densa lâmina própria. Independente se a bexiga apresenta-se cheia ou vazia esta camada permanece do mesmo tamanho.

1.2.1.1 MATRIZ EXTRA-CELULAR

A matriz extracelular é um complexo de macromoléculas composto por componentes fibrosos, proteínas e polissacarídeos secretados por células adjacentes, que se organizam em uma rede tornando-se adaptada ao tecido em que se localiza [29].

As principais fibras que compõem a matriz extracelular são as fibras colágenas, fibras do sistema elástico e fibras musculares lisas.

As fibras colágenas são assim chamadas porque uma vez fervidas formam gelatina e são utilizadas como cola, em seu estado fresco possuem a coloração branca, normalmente aparecem agrupadas em paralelo formando feixes de fibras colágenas.

Sua composição contém a escleroproteína denominada colágeno, que possui composição dividida em glicina, prolina e hidroxiprolina, e representa a proteína mais abundante do corpo humano. Com o aperfeiçoamento das técnicas de estudo revelou-se que o colágeno pertence a uma família de proteínas produzidas por diversas células, e que se distinguem em sua composição química, propriedades físicas, morfologia, distribuição dos tecidos e funções. Mais de uma dúzia de colágenos já foram descritos, sendo que os principais são de I a V.

O colágeno é sintetizado por diversos tipos celulares, como fibroblasto, osteoblasto, condrócito e célula muscular lisa, da seguinte maneira: os ribossomos codificam o RNA mensageiro através de seu retículo endoplasmático. A medida que as cadeias se formam ocorre a hidroxilação da prolina e lisina, que são incorporadas à cadeia protéica. Quando a hidroxilisina se forma começa sua glicosilação, formando as cadeias alfa, o alinhamento

das cadeias alfa formam o procolágeno, que uma vez ativado pela enzima procolágeno peptidase, formam o tropocolágeno e posteriormente se polimerizam para formar as fibrilas colágenas e posteriormente as fibras colágenas.

As fibras do sistema elástico, também são componentes da matriz extracelular, distinguem-se das colágenas por serem mais delgadas e não apresentam estriações longitudinais, possuem coloração amarelada, cedem facilmente a distensões e retornam a sua forma inicial. São sintetizadas por diversas células, fibroblastos, condrócitos e células musculares lisas.

O componente principal das fibras elásticas é a proteína elastina, que é mais resistente aos processos extrativos que o colágeno. As fibras elásticas típicas possuem além da elastina, fibrotúbulos elastínicos e as oxitalânicas, que são encontradas com menor frequência.

1.2.2 A CIRCULAÇÃO DA BEXIGA

A bexiga pode receber suprimento arterial de qualquer adjacente da artéria ilíaca interna. Por conveniência, cirurgicamente, pode-se dividir o suprimento arterial nos pedículos posterior e lateral, que se posicionam lateral e posteromedial aos ureteres no espaço retovesical, que nas mulheres são parte dos ligamentos cardinal e uterosacral.

A drenagem venosa da bexiga passa pelos plexos vesicais e então para as veias ilíacas internas. A drenagem linfática inicia-se na lâmina própria e muscular da mucosa, passando até a superfície da bexiga, drenando em sua maioria para a veia ilíaca externa, mas alguns canais de drenagem anterior e lateral podem drenar para linfonodos obturatórios e dos vasos ilíacos internos.

1.2.3 A INERVAÇÃO DA BEXIGA

Fibras eferentes autonômicas originadas na porção anterior do plexo pélvico atravessam os ligamentos lateral e posterior para inervar a bexiga. A parede vesical é amplamente inervada por terminações nervosas colinérgicas parassimpáticas, com abundantes células pós-ganglionares. A esparsa inervação simpática da bexiga proporciona o relaxamento vesical, mas provavelmente possui pouca significância funcional. Um componente autônomo não-adrenérgico e não-colinérgico (neurotransmissor ainda desconhecido), participa da ativação do detrusor. Na bexiga masculina o colo vesical recebe inervação simpática abundante e contém abundantes receptores alfa-adrenérgicos. A oxido-nítrico-sintetase tem sido identificada principalmente no trígono vesical e provavelmente está relacionada com o relaxamento do colo durante a micção.

A inervação aferente da bexiga vem pelas vias simpática (via nervos hipogástrios) e parassimpática para alcançarem os corpos celulares na raiz dorsal da medula toraco-lombar e sacral.

1.3 ANATOMIA DA PRÓSTATA

A próstata é uma glândula ímpar situada inferiormente a bexiga e contendo a uretra prostática, possui peso normal de 18g, com formato ovóide aproximando-se de uma noz. É normalmente descrita como possuindo uma base superior (que possui continuidade com o colo vesical), ápice inferior (que repousa sobre a fáscia superior do diafragma urogenital), faces anterior (relacionada com a sínfise púbica), posterior (intimamente relacionada com a face anterior do reto) e laterais. É recoberta por uma cápsula de aproximadamente 0.5mm de espessura composta, principalmente, de colágeno, elastina e fibras musculares lisas. Esta cápsula microscopicamente funde-se posteriormente com a fáscia de Denonvillier, e anteriormente possui continuidade com a fáscia endopélvica. No ápice, os ligamentos pubo-prostáticos estendem-se anteriormente para fixar a próstata no púbis. Anteriormente pode-se visualizar o plexo da veia dorsal peniana.

Lateralmente, a próstata deita-se sobre a porção pubococcígea do músculo elevador do ânus e recoberta pela fáscia endopélvica.

O ápice prostático possui em sua continuidade o esfícter uretral externo, que é composto de um músculo estriado, que histologicamente podem conter glândulas, sem entretanto apresentar estroma ou cápsula. Próximo a base, as fibras musculares longitudinais externas fundem-se com a cápsula.

O tecido glandular prostático representa duas glândulas fusionadas numa única estrutura. Estas duas porções são a zona central e zona periférica.

A zona central consiste de uma porção de tecido glandular circundando os ductos ejaculatórios e representa 20% da massa total de tecido prostático; já a zona periférica que representa aproximadamente 70% da massa prostática é

representada por uma fileira dupla de ductos originados no recesso pósterolateral da parede uretral, irradiando-se lateralmente, mantendo relação com o colículo seminal.

A uretra possui uma porção prostática, que estende-se por toda a glândula. Sua principal característica anatômica situada cranialmente à base do colículo seminal é a presença de um esfíncter muscular cilíndrico que circunda a submucosa da uretra até a região do colo vesical. Assim o desenvolvimento pleno dessas glândulas periuretrais é abortado por seu confinamento e representa em conjunto, menos de 1% do tecido glandular. Essa região é conhecida como zona de transição e representa entre 5 a 10% do total de massa prostática.

A região anterior da próstata é inteiramente não glandular, formada principalmente por fibras musculares lisas. A irrigação prostática origina-se na artéria vesical anterior, através de dois ramos principais: as artérias uretrais e artérias capsulares. A drenagem linfática faz-se para os linfonodos ilíacos internos, incluindo os obturatórios.

1.4 O CÂNCER DA PRÓSTATA

O câncer de próstata é o quarto câncer de maior incidência no homem, possuindo morbidade e mortalidade variando de forma significativa nos diversos países do mundo. A maior incidência ocorre após os 65 anos[30, 31].

A história natural do câncer de próstata é variável e imprevisível. Alguns tumores apresentam potencial maligno tão pronunciado que as metástases surgem antes que ocorram sinais locais ou sintomas sistêmicos. Em outros casos, são tão indolentes que permanecem localizados na glândula durante toda a vida do paciente, sem repercussão clínica.

O aumento do número de casos em estágios precoces à partir da década de 1970, elevou também o número de prostatectomia radical com o intuito curativo da doença neoplásica.

O diagnóstico do câncer de próstata é na maioria das vezes realizada pela biópsia prostática guiada por ultrassonografia transretal, sua indicação ocorre por elevação do PSA (Antígeno Prostático Específico), ou quando à presença de nódulo ou alteração na consistência da próstata.

Uma vez realizada a biópsia, ocorre a necessidade de estadiar e classificar o câncer da próstata para poder melhor indicar seu tratamento.

O câncer de próstata é estadiado segundo a classificação de Gleason, que avalia o grau de diferenciação das células neoplásicas prostáticas, variando entre 2 e 10, onde quanto maior o valor, mais indiferenciado e agressivo é o tumor. A prostatectomia radical é indicada para pacientes com potencial tratamento curativo pela cirurgia, geralmente com Gleason até 7 e PSA abaixo de 20 ng/ml.[32]

A cirurgia realizada pode ser por três vias, a retro-púbica, perineal e laparoscópica. A técnica mais comumente realizada até o momento é a retro-púbica, descrita abaixo[33].

1.5 A PROSTATECTOMIA RADICAL

Consiste na retirada completa da próstata e vesículas seminais com anastomose vesico-uretral.

A cirurgia realizada com paciente em regime de centro cirúrgico, posicionado em decúbito dorsal, com hiper-extensão lombar e cateterismo vesical de demora com cateter de foley, quando inicia-se a cirurgia com incisão mediana infra-púbica, abertura por planos, dissecação do espaço pré peritoneal, separando a musculatura abdominal da fáscia transversalis para acessar o espaço de Retzius, continua-se a dissecação até a fáscia endopélvica, quando pode-se visualizar anteriormente o plexo venoso prostático (Santorini).

Procede-se então a limpeza com retirada de gordura superficial e abertura da fáscia endopélvica, com exposição completa do plexo de Santorini, utilizando a dissecação digital em direção aos ligamentos pubo-prostáticos. A exposição do plexo deve ser cuidadosa evitando sangramentos excessivos, expondo o plexo junto ao ápice prostático. Após a exposição completa procede-se a ligadura do plexo com fio de sutura e posterior excisão com tesoura até alcançar a face anterior da uretra.

A uretra, então tem a sua face anterior aberta o mais próximo possível da próstata, até a exposição do cateter de foley. Secciona-se o cateter, realizando uma tração em direção superior do paciente, afim que realizar uma tração na próstata para facilitar a sua dissecação. Logo após realiza-se a excisão da face posterior da uretra.

Após a excisão uretral, realiza-se a mobilização prostática do seu leito, utilizando a dissecação digital, auxiliada com a tração pelo cateter de foley até a

base prostática, fazendo a identificação dos pedículos prostáticos laterais, que serão ligados e seccionados com hemoclips ou ligaduras com fio(fig3).

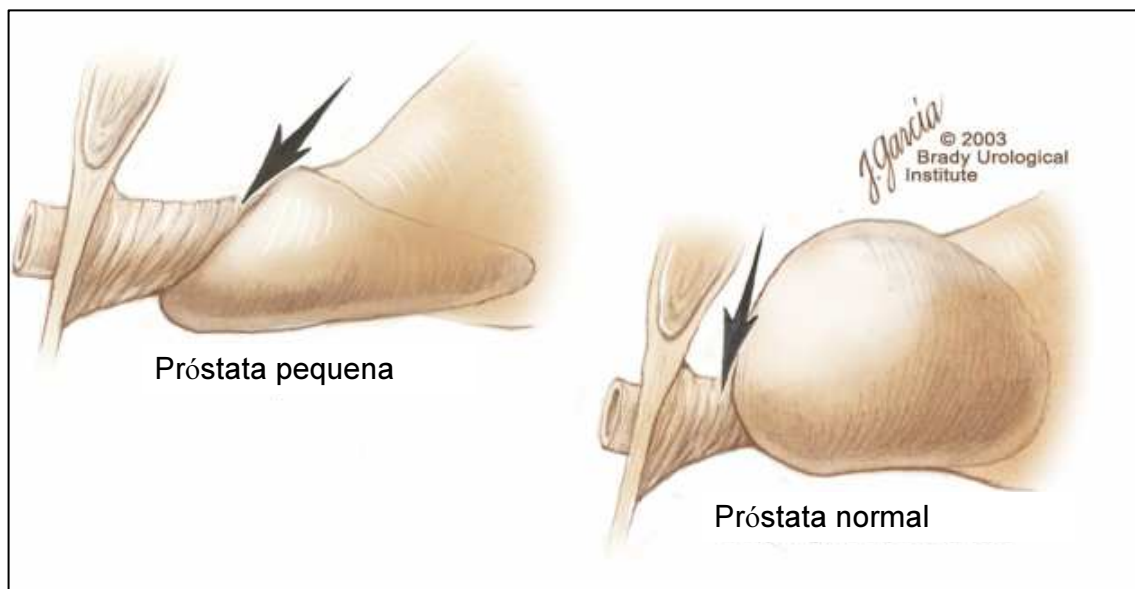


Fig 3. Local de dissecação do ápice prostático e abertura da uretra(Garcia, JR, Campbell-Walsh – Urology, Saunders, Philadelphia, 2007)

Uma vez que a próstata esteja totalmente mobilizada e dissecada, realiza-se então a dissecação das vesículas seminais, com atenção por possuir um tecido delicado e de fácil laceração, e do colo vesical, com abertura vesical com atenção para a localização dos óstios ureterais, e presença de lobo mediano proeminente, após a excisão do colo vesical, retira-se a peça cirúrgica, e prepara-se o campo para a reconstrução.

A reconstrução do colo vesical com anastomose vesico-uretral pode ser realizada com sutura contínua ou interrompida, procedendo-se primeiro o ajuste do diâmetro do colo para depois realizar a anastomose, tomando o cuidado de manter o nó formado pela sutura na face externa da anastomose e da introdução de um cateter de foley, que permanecerá na bexiga até a cicatrização completa da anastomose[34-36](fig4).

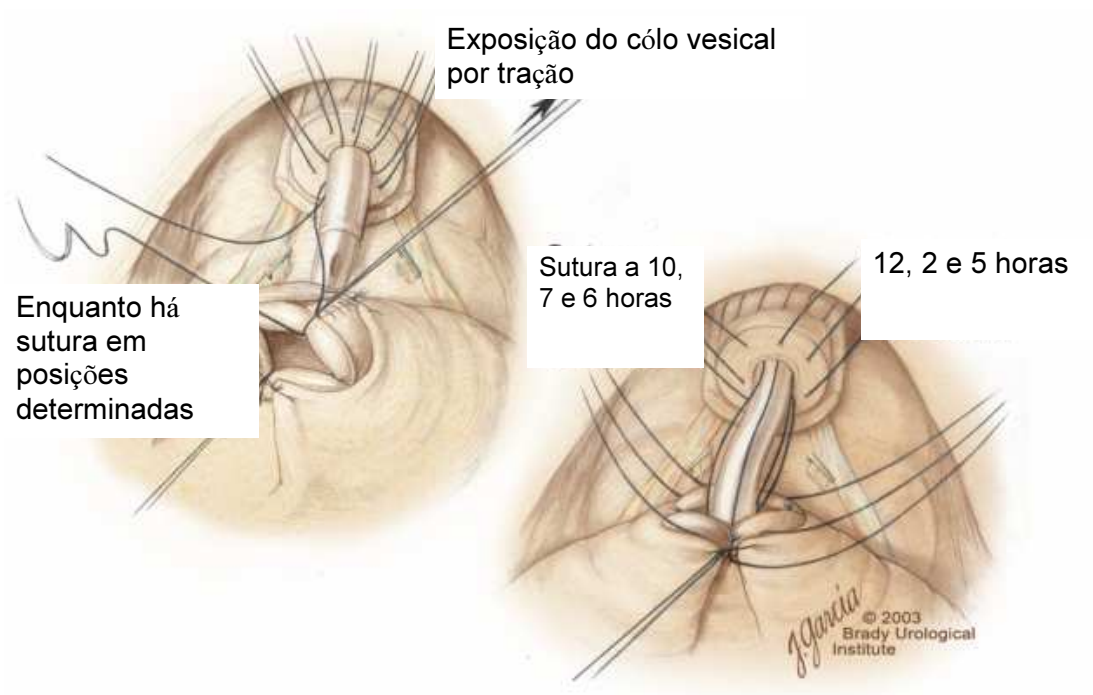


Fig4. Anastomose vesico-uretral com pontos separados (Garcia, JR, Campbell-Walsh – Urology, Saunders, Philadelphia, 2007)

Várias complicações estão descritas na literatura mundial, dentre elas a disfunção erétil, incontinência urinária e estenose da anastomose uretro-vesical[34, 37, 38].

1.6 AS COMPLICAÇÕES DA PROSTATECTOMIA RADICAL

A prostatectomia radical possui complicações inerentes ao procedimento que interferem diretamente na qualidade de vida dos pacientes operados. As complicações recentes inerentes ao procedimento são, além das complicações normais de qualquer cirurgia, o sangramento per-operatório, e o extravasamento de urina que ocorre nos primeiros dias do pós-operatório, geralmente possuem fácil resolução, e raramente trazem consequências posteriores.

Já as complicações tardias estão relacionadas a uma importante piora da qualidade de vida, com necessidade de uso de fraldas descartáveis, medicamentos, uso prolongado de cateter vesical de demora e até cirurgias posteriores, são elas a Incontinência Urinária, Disfunção Erétil e a Estenose do Colo Vesical [34, 39, 40], que serão abordadas abaixo.

1.6.1 A INCONTINÊNCIA URINÁRIA

A incontinência urinária pós prostatectomia radical é a perda involuntária de urina que ocorre após 6 meses da citada cirurgia, a perda urinária que ocorre nos primeiros seis meses de pós-operatório é considerada como transitória, não estando, portanto, classificada como complicação tardia.

Sua incidência na literatura entre 15% e 65% aproximadamente e é tida como de muita importância para a qualidade de vida destes pacientes [34, 40, 41].

Este tipo de complicação ocorre, principalmente, por lesão do esfíncter urinário, que é um músculo estriado esquelético que localiza-se na uretra, envolvendo-a, próximo ao ápice prostático. Estima-se que sua lesão ocorra durante a dissecação desta região. Este tipo de incontinência urinária é

classificada como incontinência de stress, pois a perda urinária ocorre por esforço físico.

Outro tipo de incontinência urinária pós prostatectomia radical é a incontinência paradoxal ou por transbordamento, que está relacionada e estenose do colo vesical e será abordada posteriormente.

1.6.2 DISFUNÇÃO ERÉTIL

A disfunção erétil, conhecida popularmente por impotência é uma complicação tardia que ocorre em aproximadamente entre 50% e 85% dos pacientes [39, 40] levando-se em consideração qualquer grau de disfunção erétil, independentemente da manutenção desta vida sexual.

É tida como uma complicação tardia de mais fácil tratamento, embora afete a qualidade de vida do homem [39, 40, 42], o desenvolvimento dos inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5), as injeções intra-cavernosas e o implante da prótese peniana que é a última linha da tratamento possui uma boa taxa de resolubilidade, com baixa morbidade

1.6.3 A ESCLEROSE DA ANASTOMOSE COLO-VESICAL

A estenose do colo vesical pós-prostatectomia radical (ECV) representa o estreitamento da sutura da anastomose entre a bexiga e uretra, ocorre em aproximadamente 9,4% dos pacientes submetidos à prostatectomia radical retro-púbica[43], embora existam poucos trabalhos de avaliação de qualidade de vida nestes pacientes, a presença de cateterismo vesical de demora por

tempo prolongado ou de tratamento complementar, seja por sessões de dilatação implica de certa forma na qualidade de vida destes pacientes[42-44].

O quadro clínico de um paciente portador da ECV, é semelhante ao de um paciente com HPB, normalmente apresentam LUTS, com os mesmos sinais e sintomas relacionados a esta doença prostática. Pacientes podem apresentar incontinência urinária tipo paradoxal também conhecida como incontinência por transbordamento, onde sua causa não é a lesão esfinteriana mas sim a estenose do cólo vesical [44, 45].

Um estudo retrospectivo considerando a hipótese da esclerose da anastomose colo-vesical pós prostatectomia radical ter origem em uma doença microvascular, analisou os pacientes que desenvolveram esta doença separando entre os seguintes fatores de risco: doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença arterial coronariana (DAC), Diabetes Mellitus (DM), tabagismo, perda sanguínea per-operatória, tempo cirúrgico, e história prévia de ressecção transuretral prostática (RTUP), concluiu que o consumo de cigarro é um importante fator para o desenvolvimento de esclerose da anastomose colo-vesical.[10].

A presença da ECV, normalmente, há sintomas obstrutivos infra-vesicais, com repercussão urodinâmica, podendo ter seu diagnóstico firmado por, além dos sintomas clínicos, com exames urodinâmicos e de imagem.[37].

1.7 A UROFLUXOMETRIA LIVRE

A urofluxometria é um exame não-invasivo, de baixo custo, de fácil realização na avaliação de pacientes com disfunção miccional. Normalmente precede outras avaliações urodinâmicas e fácil e rapidamente consegue fornecer dados sobre a micção e armazenamento vesicais. O exame consiste em uma micção espontânea do paciente após plenitude vesical espontânea em um sensor de fluxo.

Em uma micção normal inclui-se a contração do músculo detrusor, relaxamento do colo vesical coordenado, baixa pressão de micção e uma curva de fluxo leve e com contorno arqueado.

O formato da curva de micção podem, somente, servir para um diagnóstico presuntivo, mas não para o definitivo. Em um paciente com obstrução infra-vesical, a curva de micção apresenta-se com baixo platô, tempo de micção prolongado, fluxo máximo baixo e elevado tempo para o fluxo máximo. Embora existam diversos trabalhos onde tentam-se estimar a obstrução infra-vesical unicamente com a urofluxometria livre, este exame é insuficiente para confirmar este diagnóstico pois os dados fornecidos não são suficientes para distinguir entre a obstrução infra-vesical e hipocontratilidade detrusora.

É considerada uma urofluxometria normal em homens aqueles com fluxo máximo ($Q_{\text{máx}}$) acima de 15ml/s, com curva em forma de sino e volume entre 400 e 500ml. [2, 46, 47]

A figura 5 demonstra esquematicamente a micção espontânea e consequente registro pelo sensor de fluxo do aparelho de urodinâmica; o figura 6 é uma representação gráfica de um exame de urofluxometria livre e seus parâmetros observados.

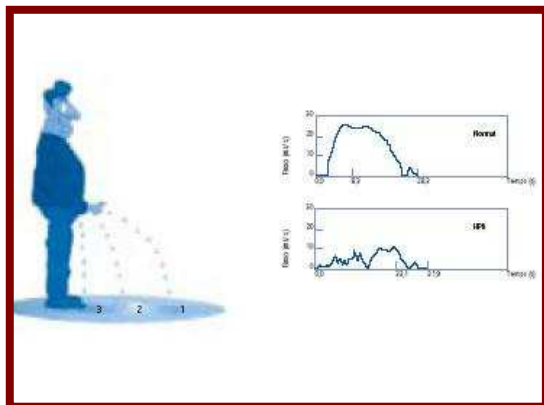


Figura 5. Fluxometria Normal e com baixo fluxo
(<http://www.sapo.pt>)

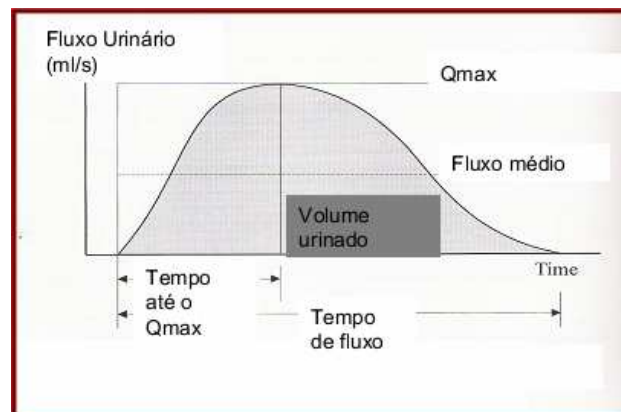


Figura 6. Gráfico urofluxometria livre [2]

1.8 O IPSS (INTERNATIONAL PROSTATE SCORE SYMPTOMS)

Introduzido em 1992, este índice tem sido amplamente validado e utilizado em consultas urológicas de vários países, como um importante avaliação de homens com Sintomas do Trato Urinário Baixo (*Lower Urinary Tract Symptoms – LUTS*).

Consiste em sete questões divididas em dois campos, o primeiro relacionado com a micção, onde possuem perguntas referentes ao armazenamento de urina (sintomas irritativos ou de armazenamento), e outras referentes à micção propriamente dita (sintomas obstrutivos ou de esvaziamento). O segundo campo possui uma única pergunta em relação à qualidade de vida. O escore total varia entre 0 e 35, onde classificam-se os sintomas em de 0 a 7, leve, de 8 a 19, moderado e de 20 a 35 grave.

Embora seja um exame de simples aplicação e execução, possui limitações, como paciente com doença neurológica, dificuldade de compreensão das questões. Além disso, a avaliação sobre a vida social e familiar destes pacientes vem ganhando importância na literatura mundial, uma vez que mais mesmo tendo grande importância, os problemas sociais influenciam no primeiro segmento do questionário, e, portanto, na conduta diagnóstica e terapêutica[1, 48, 49].

Apesar destas limitações o IPSS continua sendo amplamente recomendado na avaliação inicial de homens com LUTS, bem como podendo servir como avaliação da possibilidade de tratamento.

Abaixo está extraído o IPSS validado em português.

ESCORE INTERNACIONAL DE SINTOMAS PROSTÁTICOS - IPSS							
NOME	NUNCA	MENOS DE 1 EM 5 VEZES	MENOS DA METADE DAS VEZES	A METADE DAS VEZES	MAIS DA METADE DAS VEZES	QUASE SEMPRE	TOTAL
1. No último mês, quantas vezes teve a sensação de não ter esvaziado completamente a bexiga após urinar?	0	1	2	3	4	5	
2. No último mês, teve que urinar novamente em menos de duas horas da última micção?	0	1	2	3	4	5	
3. No último mês, quantas vezes durante a micção, o jato foi interrompido e retornou sozinho?	0	1	2	3	4	5	
4. No último mês, quando teve vontade de urinar, quantas vezes teve dificuldade para segurar?	0	1	2	3	4	5	
5. No último mês, quantas vezes teve o jato urinário fraco?	0	1	2	3	4	5	
6. No último mês, quantas vezes teve que fazer força para urinar?	0	1	2	3	4	5	
NOCTÚRIA	NUNCA	1 VEZ	2 VEZES	3 VEZES	4 VEZES	5 OU MAIS VEZES	
7. No último mês, quantas vezes em média teve que levantar à noite para urinar?	0	1	2	3	4	5	
TOTAL GERAL							
QUALIDADE DE VIDA	ÓTIMO	MUITO SATISFEITO	SATISFEITO	MAIS OU MENOS SATISFEITO	MAIS INSATISFEITO	INFELIZ	MUITO INFELIZ
Se tivesse que passar o resto da vida urinando como está hoje, como se sentiria?	0	1	2	3	4	5	6

Netto Jr, 1997 [1]

1.9 JUSTIFICATIVA PARA A INVESTIGAÇÃO

As alterações morfológicas relacionadas ao tabagismo no trato urinário ainda não foram bem estabelecidas ao contrário de sua importância clínica e epidemiológica para o risco, desenvolvimento e complicações de patologias.

2. OBJETIVO

Avaliar as alterações morfológicas do colo vesical de fumantes e não fumantes, submetidos à prostatectomia radical e correlacionar os dados obtidos com dados clínicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Descrição de métodos empregados, aspectos éticos e analíticos

3.1 SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).

O presente estudo foi submetido ao CEP do Hospital Universitário Pedro Ernesto, e todos os voluntários participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Foram selecionados voluntários entre os pacientes submetidos à prostatectomia radical retro-púbica no Hospital Naval Marcílio Dias como tratamento para o câncer de próstata entre, totalizando 16. Divididos em dois grupos, o primeiro tabagista, com 7 e o segundo não tabagista com 9 voluntários.

O número de voluntários em cada grupo foi estabelecido através da fórmula:

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha} \cdot \sigma}{ME} \right)^2,$$

Onde:

Z_{α} = nível de significância desejado;

σ = desvio padrão

ME = Margem de erro tolerável.

Considerando que todas as variáveis tenham distribuição normal em pequenas amostras por tratar-se de material colhido de seres humanos, o desvio-padrão obtido nas avaliações da amostra e a margem de erro aceitável,

que nos trabalhos morfológicos podem chegar à 10%, neste caso utilizamos a significância desejada de 95%, o desvio padrão obtido no próprio trabalho de 3,84, e margem de erro de 3,33% (que corresponde à 1/3 das referências na literatura), obtivemos um número necessário em cada grupo de 5,1 voluntários.

Foram coletados de todos os 16 voluntários do trabalho um fragmento de aproximadamente 1cm de diâmetro do colo vesical, durante a prostatectomia radical logo após a retirada da próstata e vesículas seminais e antes da realização da anastomose vesico-uretral.

O material foi processado para inclusão em parafina. Inicialmente os cortes foram corados pela hemtoxilina / eosina (H&E) verificando-se a integridade do tecido e posteriormente submetido a outras técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas.

A observação, caracterização e quantificação do músculo liso e dos elementos fibrosos do tecido conjuntivo (colágeno e fibras do sistema elástico) foram realizadas em cortes corados pela coloração de Van Gieson e Resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação pela oxona. Todos os elementos estudados foram quantificados através de métodos estereológicos que determinam parâmetros tridimensionais a partir de cortes bidimensionais.

Foram obtidos 5 cortes de cada uma das amostras e contados 5 campos por corte totalizando 25 campos por indivíduo para cada uma das técnicas utilizadas.

Os resultados foram obtidos pelo método de contagem de pontos utilizando-se o software ImageJ®(Image Processing and Analysis in Java). De acordo com os princípios estereológicos, a distribuição por área é proporcional à distribuição por volume, quando a região considerada é homogênea [50]. A

espessura da parede arterial foi realizada com cortes em ampliação de 1000x, e contagem realizada com a ferramenta de régua do software ImageJ®.

3.3 Processamento histológico e Coloração

Preparação da mostra para análise microscópica

3.3.1 - Histoquímica

Cada amostra foi fixada em formalina tamponada a 10%. Os espécimes foram processados para inclusão em parafina.

Os cortes de 5µm de espessura foram corados inicialmente com H&E para verificar a integridade do material.

Para evidenciar as fibras do sistema elástico foi utilizada a coloração da Fucsina - Resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona. O reativo de Weigert é formado pela precipitação da fucsina básica-resorcina pelo cloreto de ferro demonstrando a presença de fibras elásticas e elaulínicas e após uma etapa de oxidação com ácido peracético/oxona, também as fibras oxitalânicas. Um tratamento inicial com uma solução de permanganato de potássio acidificada em ácido oxálico promove um clareamento de fundo [51], resultando as fibras elásticas coradas em violeta-escuro. Van Gieson para a caracterização do tecido conjuntivo e fibras musculares lisas.

3.4 - Aquisição das Imagens

Foram obtidos 5 cortes de cada uma das amostras e contados 5 campos por corte totalizando 25 campos por indivíduo para cada uma das técnicas utilizadas.

Os campos foram obtidos usando-se uma videocâmara acoplada ao microscópio de luz Olympus, com um aumento de 200X para a coloração de Van Gieson, 400x para a Resorcina-fucsina de Wiergert com prévia oxidação e 1000x com lente embebida em óleo para captura das imagens vasculares. As imagens foram convertidas em sinais digitais e foram transferidos ao computador. Os dados foram obtidos pelo método de contagem de pontos, utilizando o software ImageJ®(Image Processing and Analysis in Java).

3.5 - Estereologia

Através de métodos estereológicos foram analisados 10 cortes de cada uma das amostras e contados 10 campos por corte totalizando 100 campos por indivíduo.

A Estereologia é uma metodologia atual que permite o conhecimento tridimensional de um órgão, tecido ou certa estrutura através da determinação de parâmetros quantitativos (quantificação) em imagens bidimensionais. Para isso utiliza-se de princípios geométricos, matemáticos, estatísticos, e principalmente de bom senso [52, 53], [54].

Dois conceitos são básicos na Estereologia: o princípio de Delesse e o princípio de Cavalieri.

Segundo o princípio de Delesse a mensuração de uma área transversal relativa de objetos em relação à área total da estrutura, denominada de densidade de área (A_A), dá uma estimativa sem viés do volume desses objetos. Esse estimador é chamado de densidade de volume (V_V). Ou seja, o princípio de Delesse consiste em aceitar que a relação entre parâmetros parciais e absolutos é similar.

Segundo o princípio de Cavalieri, a partir de cortes seriados de uma certa estrutura podemos conhecer o seu volume, sendo para tal imprescindível conhecer a espessura da microtomia, porém não sendo necessário que todos os cortes da série sejam analisados. Podemos contar um corte a cada intervalo sistemático sem que isso, estatisticamente, diminua a acurácia do método. O trabalho de contagem assim fica reduzido e mais rápido [52, 53], [54].

A aquisição de dados na maioria dos estudos estereológicos é obtida diretamente de imagens, normalmente oriunda de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão [52, 53], [54].

De acordo com [55], um dos primeiros autores a descrever um método para estimar a densidade de volume com a ajuda de um conjunto de pontos-teste. Esse método é chamado de “método de contagem de pontos” no qual P_P é a razão entre o número de pontos-teste que tocam a superfície do objeto e o número de pontos que tocam a superfície da estrutura. Sendo assim:

$$\frac{A_p}{A_T} = \frac{V_p}{V_T} = \frac{P_p}{P_T} \quad \text{e} \quad A_A = V_V = P_P$$

onde P_p = pontos-teste que tocam o objeto (pontos parciais) e P_T = pontos-teste que tocam a estrutura (pontos totais) [55].

Na estereologia os resultados são obtidos através da contagem de pontos-teste e interseções-teste aplicando-se algumas fórmulas matemáticas definidas previamente considerando-se a geometria da construção do sistema-teste.

Um sistema teste é um sistema de linhas (retas ou curvas) e pontos que pode ser superposto a uma imagem morfológica para a contagem estereológica [52, 53]. Tradicionalmente, os sistemas-teste são desenhados com linhas retas ou segmentos de linhas retas, apresentando um arranjo triangular, quadrangular ou hexagonal. Cada um desses arranjos determina as características básicas do sistema-teste.

3.6 - Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os testes de análise de variâncias (ANOVA) com análise pós-teste de Tukey, e confirmação com teste t de Student não pareado, utilizando-se o pacote estatístico GraphPad Prism4[®]. Todos os resultados foram dados em media $\pm$ seus desvios-padrões, e a significância estatística foi considerada com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Foram obtidos os seguintes resultados, no grupo fumante a quantidade de fibras colágenas foi de 22,70% (DP = 4,86), fibras do sistema elástico 13,29% (DP = 3,84) e musculares lisas foi de 23,97% (DP = 12,3), e altura da parede vascular de 16,52 μ m (DP = 2,73), enquanto no grupo não fumante foi de 21,20% (DP = 8,21) para fibras colágenas, 8,14% (DP = 3,54) para fibras do sistema elástico, 23,97% (DP = 8,01) para fibras musculares lisas e 25,80 μ m (DP = 7,18) para altura da parede vascular.

Quanto aos parâmetros de análise clínica o IPSS dos tabagistas teve média de 18,40 (DP = 5,58), enquanto a média dos não tabagistas foi de 9,39 (DP = 3,73), o fluxo máximo obtido pela urofluxometria livre (Qmax) teve média de 4,80ml/s (DP = 1,72), e de 9,60ml/s (DP = 3,20) nos não tabagistas.

Após a análise estatística observou-se no grupo tabagista, aumento da quantidade de fibras colágenas, diminuição de fibras musculares lisas com $P > 0,05$. Houve ainda aumento da quantidade de fibras do sistema elástico no grupo tabagista e diminuição da altura da parede vascular neste mesmo grupo com $P < 0,05$.

Pela avaliação clínica observamos aumento do IPSS e diminuição do Qmáx ambos com $P < 0,05$, no grupo tabagista.

As análises de correlação demonstraram $R = -0,67$ ($P < 0,05$) entre a quantidade de fibras do sistema elástico e altura da parede vascular, $R = 0,55$ ($P < 0,05$) entre a quantidade de fibras do Sistema elástico e IPSS, $R = -0,54$ ($P < 0,05$) entre fibras do sistema elástico e Qmax, $R = -0,59$ entre a altura da

parede vascular e IPSS, $R = 0,47$ ($P=0,06$) entre Altura da parede vascular e Q_{max} , e $R = -0,94$ ($P<0,05$) entre IPSS e Q_{max} .

Abaixo estão expostas as fotomicrografias e imagens referentes aos principais resultados:

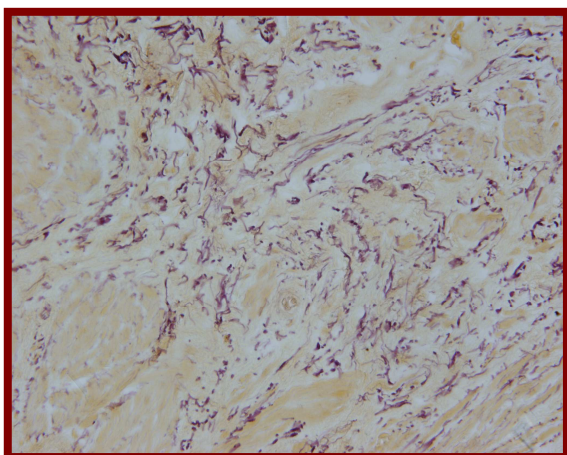


Figura 8. Fotomicrografia – Resorcina-Fucsina de Weigert – tabagista 400x

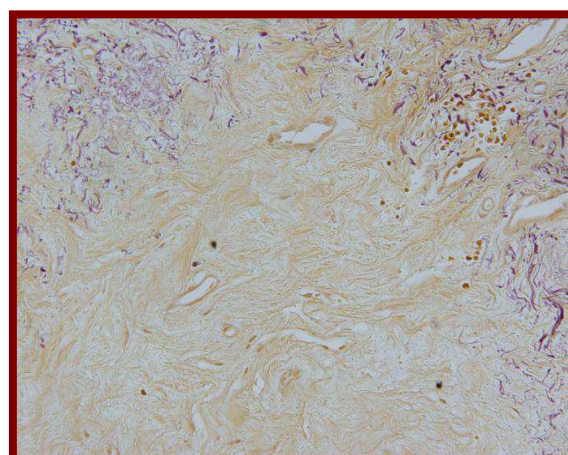


Figura 9. Fotomicrografia – Resorcina-fucsina de Wiegert – não tabagista 400x

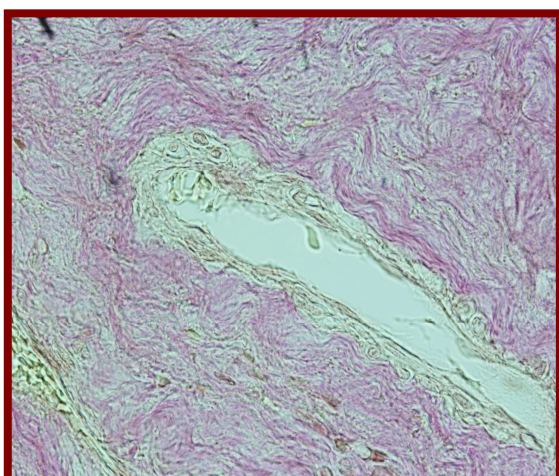


Figura 10. Parede vascular tabagista – 1000x Van Gieson

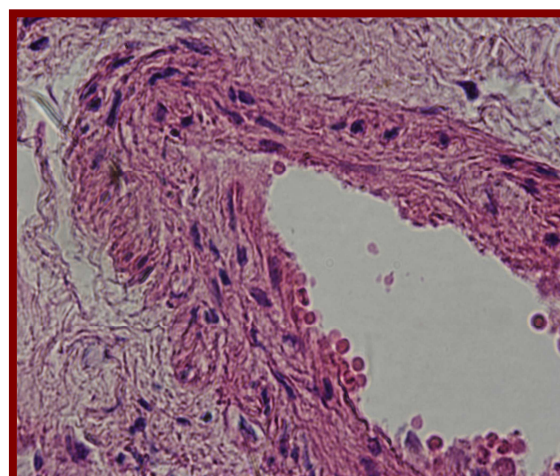


Figura 11. Parede vascular não tabagista – 1000x H&E

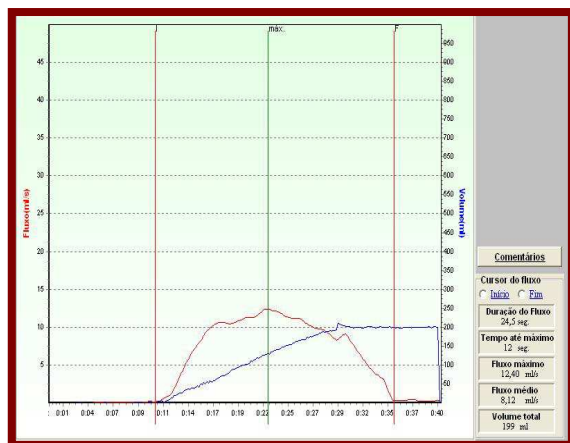


Figura 12. Urofluxometria livre não tabagista – Qmáx de 12,40ml/s

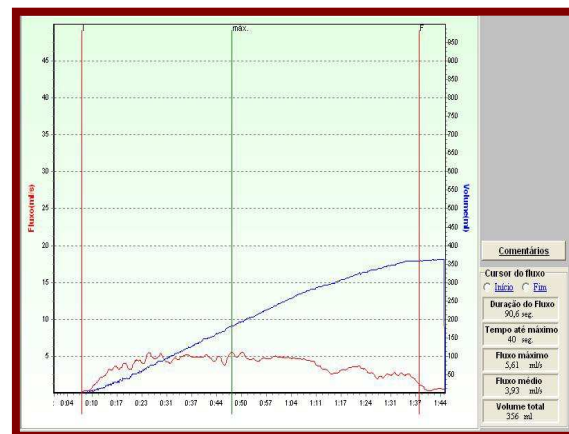


Figura 13. Urofluxometria livre tabagista – Qmáx de 5,41ml/s

As tabelas abaixo resumem os resultados obtidos:

	Fibras Colágenas	Fibras musculares lisas	Fibras do Sistema Elástico	IPSS	Qmax	Parede Arterial (espessura)
Fumantes	22,74	23,97	13,29	18,40	4,79	16,53
DP	4,86	12,31	3,85	5,59	4,72	2,73
Não fumantes	23,14	29,36	8,38	9,39	9,61	25,87
DP	8,21	8,02	3,54	3,73	3,20	7,19

Tabela 1. Média e desvio padrão. Fibras Colágenas, Musculares lisas e do sistema elástico em porcentagem. IPSS com número absoluto, Qmax em ml/s, e espessura da parede arterial em μm .

	Fumantes	Não Fumantes	p
Fibras colágenas	22,70	21,20	0,904
Fibras musculares lisas	23,97	27,97	0,338
Fibras do sistema elástico	13,29	8,14	0,020
IPSS	18,40	9,67	0,004
Qmax	4,80	9,45	0,040
Parede Arterial (espessura)	16,52	25,80	0,005

Tabela 2: ANOVA e Teste T. Fibras Colágenas, Musculares lisas e do sistema elástico em porcentagem. IPSS com número absoluto, Qmax em ml/s, e espessura da parede arterial em μm .

Correlação de Pearson	<i>R</i> <i>Fumantes</i>	<i>R</i> <i>não</i> <i>fumantes</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
Elastic X IPSS	0,39	0,09	0,55	<0,05
Elastic X Qmax	-0,33	-0,30	-0,52	<0,05
Elastic X V. Wall	-0,63	-0,47	-0,67	<0,05

Tabela 3. Análise de correlação de Pearson. R em número absoluto e p considerado significativo com resultado com $p < 0,05$

Nos gráficos abaixo os números em amarelo expressam médias e desvio padrão:

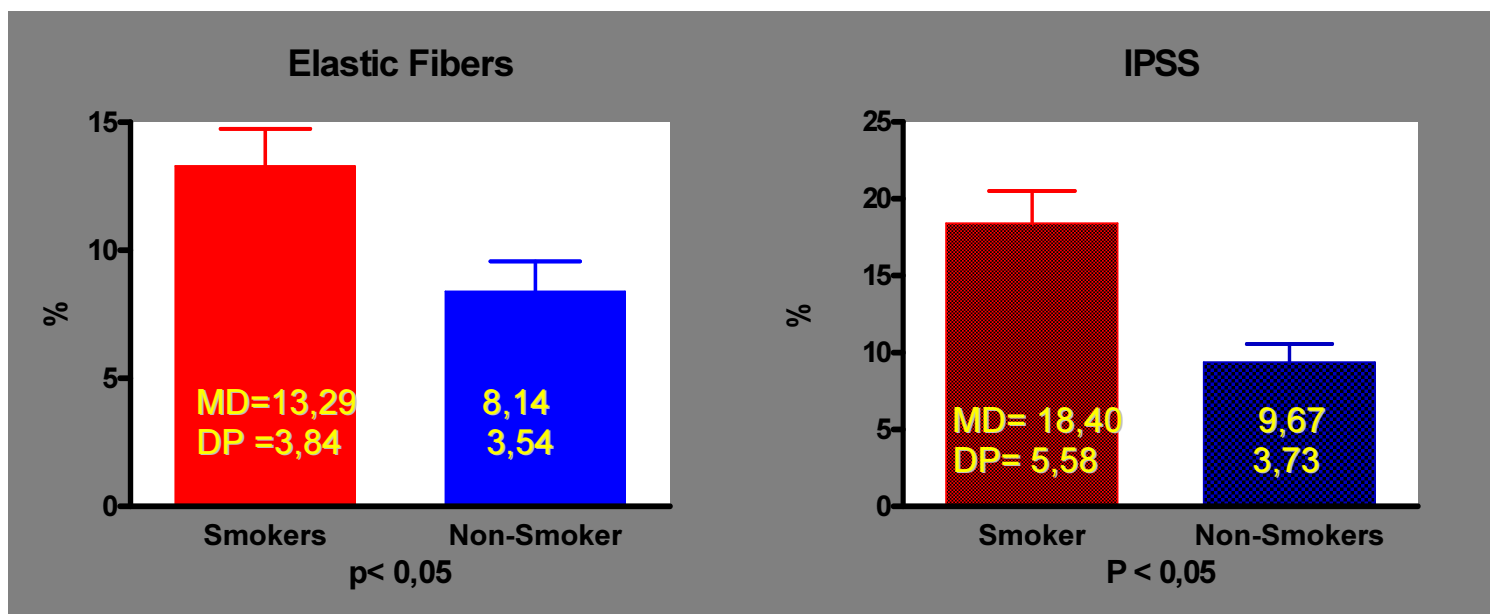


Gráfico 1: Quantidade de fibras do sistema elástico, comparação entre os grupos.

Gráfico 2: Comparação do IPSS entre os grupos.

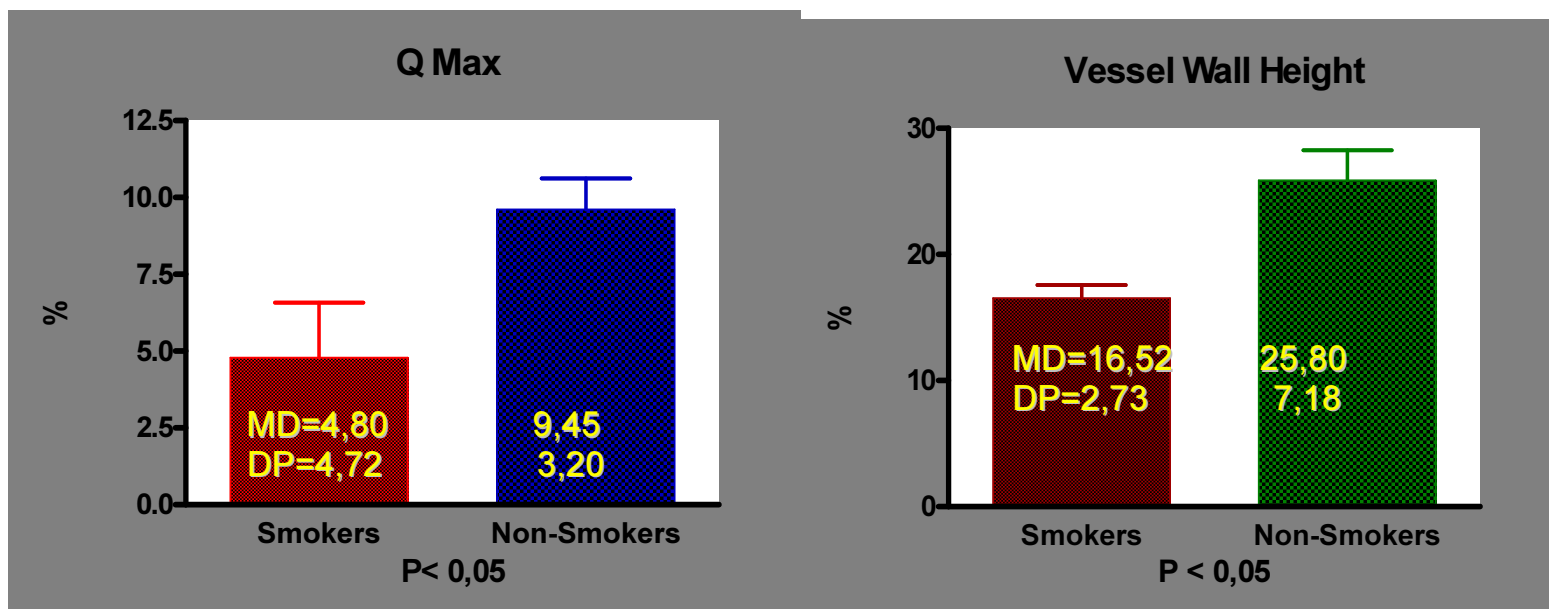


Gráfico 3: Urofluxometria. Fluxo Máximo, comparação entre os grupos.

Gráfico 4: Altura da parede arterial. Comparação entre os grupos

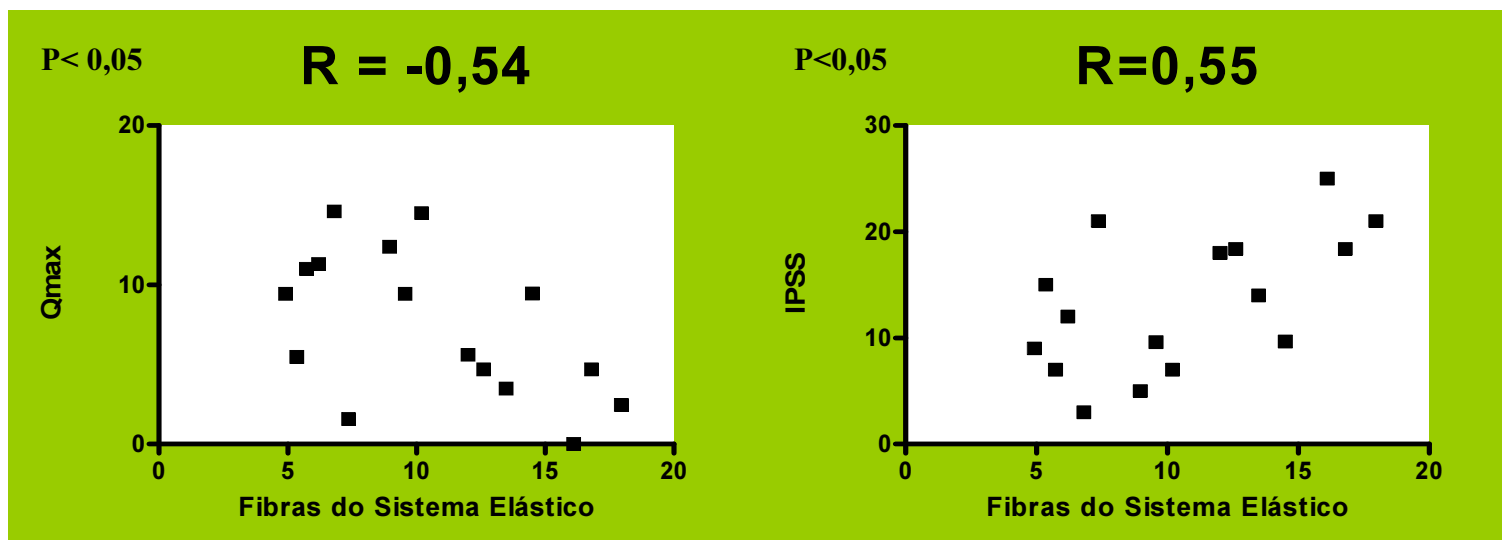


Gráfico 5: Correlação de Pearson Q_{máx} e Fibras do Sistema Elástico.

Gráfico 6: Correlação de Pearson IPSS e Fibras do Sistema Elástico.

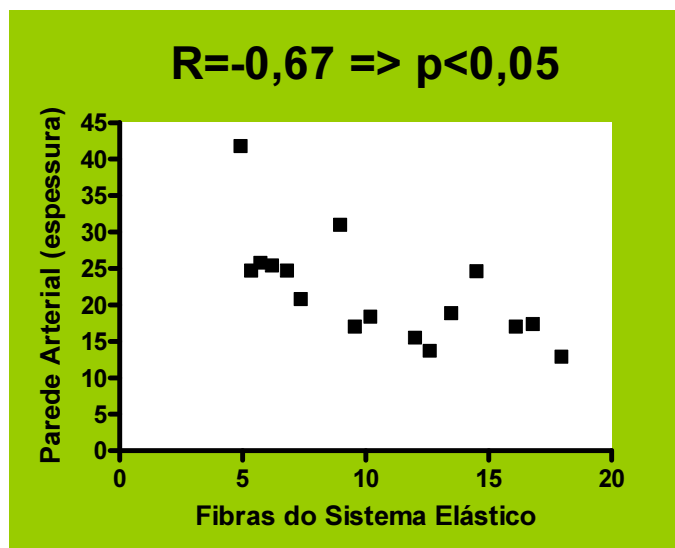


Gráfico 7: Correlação de Pearson espessura da parede arterial e Fibras do Sistema Elástico.

5. DISCUSSÃO

Os efeitos do consumo do cigarro e suas conseqüências clínicas são descritos em diversas áreas da urologia, relacionando-se com o desenvolvimento de doenças crônicas e oncológicas tais como o câncer de bexiga e próstata, disfunção erétil, esclerose de colo vesical pós prostatectomia radical, muito já foi descrito sobre seus efeitos em diversos tecidos, mas sobre a circulação do colo vesical não foram previamente caracterizados na literatura. Borboroglu em 2000 avaliou os pacientes que apresentavam esclerose da anastomose colo vesical entre os portadores dos seguintes fatores de risco: doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença arterial coronariana (DAC), Diabetes Mellitus (DM), tabagismo, perda sanguínea per-operatória, tempo cirúrgico, e história prévia de ressecção transuretral prostática (RTUP) e concluiu que o consumo de cigarro é um importante fator para o desenvolvimento da esclerose da anastomose colo-vesical [10]

Embora o autor tenha realizado um estudo descritivo, com avaliação epidemiológica em quase a totalidade de seu trabalho, sugeriu que possa existir uma doença arterial presente com conseqüente alteração da microcirculação, uma vez que seus resultados mostraram que diversas comorbidades associadas à doença microvascular são importantes fatores de risco para o desenvolvimento da estenose do colo vesical [10].

Mack et al. Em 2003, realizou um estudo para avaliação dos efeitos do consumo crônico do tabaco utilizou como abordagem de avaliação a ultrassonografia com doppler colorido para buscar uma associação entre a exposição à nicotina e a elasticidade da carótida. Constatou uma diminuição da

elasticidade destas artérias, atribuindo esta alteração como consequência do uso da nicotina, estando diretamente associada a carga de tabaco. Em seus resultados encontrou um aumento da espessura da camada íntima, onde atribuiu este achado a diminuição da elasticidade [22], estas alterações quando presentes na aorta foram descritas como fatores de predisposição para dissecação desta artéria [23].

A diminuição da elasticidade da parede das artérias do colo vesical em 35,96% está de acordo com a literatura, onde o consumo da nicotina é fator de risco para aterosclerose, trombose, injúria do tecido, formação de íons superóxidos e radicais livres, reduzindo a produção e disponibilidade de Óxido Nítrico, aumentando a produção de endotelina, levando à disfunção endotelial, trombose, aterosclerose e outras patologias endoteliais [11-13], diminuindo a elasticidade de grandes artérias. [12, 22, 56], com conseqüentes distúrbios da organização, stiffness, calcificação e disfunção vasomotora [24], que estão diretamente relacionadas como a diminuição da oxigenação dos tecidos [57]. Embora Raveendran ET AL em 2004, tenham relacionado estas alterações ao metabolismo do colágeno [58], nossos resultados indicam que há modificação no metabolismo das fibras do sistema elástico através de alterações na produção e metabolismo das metaloproteinases [25, 27], que altera a integridade da matriz extra-celular, função celular e estabilidade estrutural dos vasos [24, 59]. No nosso estudo há correlação estatística entre a espessura com a quantidade de fibras elásticas no colo vesical com significância estatística, podendo-se presumir o mesmo mecanismo de lesão vascular e circulatória esteja presente no colo vesical e provavelmente em toda a bexiga (tabela 3).

Em relação aos dados laboratoriais, no presente trabalho, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos quando comparadas a quantidade de fibras colágenas e musculares lisas. Os relatos de alterações na síntese e depósito do colágeno decorrente da exposição a 7H-dibenzo(c,g) carbazole que é um componente do tabaco representam alterações para induzir metaplasia escamosa traqueobrônquica, que está diretamente relacionada com aumento do colágeno tipos I e III na camada subepitelial da matrix extra-celular. Estas alterações são foram observadas após a insitilação do 7H-dibenzo(c,g) carbazole em hamsters e que por análise imunohistoquímica conseguiu diferenciar as características de cada tipo de colágeno. Estes achados parecem sem específicos do trato respiratório, traquéia e brônquios, na progressão neoplásica durante o processo de indução tumoral. [19]. No nosso caso a ação do tabaco não é direta e, portanto os efeitos se manifestam de forma diferente do que aqueles encontrados no pulmão o que justifica os resultados conflitantes com os estudos prévios.

Em relação à quantidade de fibras musculares lisas existem diversos trabalhos relacionados ao tabaco e hiperreatividade e hipersensibilidade celular, principalmente relacionado ao trato respiratório [60-64], poucos relacionam a quantificação destas fibras a exposição ao tabaco, os resultados no tecido cutâneo não revela alterações, no entanto, em estroma prostático de ratos expostos à nicotina, há aumento da quantidade de fibras musculares lisas [27, 65].

Nossos resultados não demonstram alterações significativas quando comparamos os grupos, corroborando com o resultado do estudo realizado com pele humana e com o trabalho que avaliando o sistema arterial de

pacientes com Síndrome de Marfan, onde concluiu-se que a perda da integridade de fibras do sistema elástico resulta em diminuição da quantidade de fibras musculares lisas na aorta torácica, neste caso relacionado com a degradação ocorrida por alterações do metabolismo das metaloproteinases [24, 59]. Como o trabalho onde foi evidenciado o aumento de fibras musculares lisas foi realizado com hamsters, é possível que o resultado seja influenciado devido às alterações inerentes a este animal, ou ao tipo de exposição realizado durante o estudo, justificando os resultados conflitantes.

Estudos *in vitro* indicaram que o consumo do tabaco impede a produção de colágeno e aumenta a produção de tropo elastina e ativação das metaloproteinases causando uma degradação das proteínas da matriz e uma produção anormal de material elástico, tanto em sua morfologia quanto em quantidade, tendo como consequência o aumento da quantidade de fibras do sistema elástico, que pode ser evidenciado na pele [22, 24, 25, 27, 28, 59]. Em nossos resultados evidenciamos um aumento de 63,26% de fibras do sistema elástico na parede do colo vesical do grupo tabagista em relação aos não fumantes, o que está de acordo com estes resultados.

A degradação das fibras do sistema elástico e suas consequências não se limitam somente a matriz extracelular, diversos autores relacionam a degradação destas fibras a outras alterações morfológicas e funcionais, tais como a perda de tecido muscular liso arterial, com diminuição da contratilidade e aumento do risco para dissecções de grandes artérias. Morita em 2007 associou estes achados ao envelhecimento precoce da pele [26, 27], constatado em seus estudos com pele de ratos.

O efeito do tabagismo sobre o sistema arterial e conseqüente formação de fibras do sistema elástico e suas demais conseqüências, não devem se limitar ao colo vesical, estando distribuído em toda a bexiga, com aumento da quantidade de fibras do sistema elástico em toda a parede vesical e suas repercussões, podendo ter como conseqüência o envelhecimento vesical precoce, mas não há como obter conclusões definitivas, uma vez que não há dados prévios na literatura sobre o envelhecimento da bexiga, nem de alterações morfológicas em outros segmentos vesicais relacionados ao consumo da nicotina.

Embora os resultados obtidos nos dados clínicos tenham sido estatisticamente significativos, devem ser observados com parcimônia, uma vez que o desenho do estudo não foi para avaliação clínica e sim para avaliação morfológica, e como não há dados anteriores da função vesical em fumantes, faz com que os dados obtidos possam ser, mesmo com significância estatística, fruto de coincidência, necessitando de estudo clínicos futuros para confirmação dos resultados. Os resultados serão discutidos apenas para que possam ser confrontados em estudo futuros.

Os resultados encontrados nos dados clínicos indicam supostamente um impacto relacionado ao consumo do tabaco tanto no resultado do IPSS, com aumento de aproximadamente 93%, quanto no Qmax, redução em cerca de 51%. Refletindo em uma redução da função miccional estatisticamente significativa em tabagistas quando comparados com aqueles que não foram expostos a nicotina.

Estas alterações podem ocorrer devido à formação morfológica anômala que aumenta a quantidade de fibras do sistema elástico e suas conseqüências.

Assim como o sistema arterial, perdendo sua função elástica e contrátil, o que reflete nos resultados clínico obtidos, que podem muito bem estar associados a um envelhecimento precoce do detrusor.

As análises de correlação entre os dados quantitativos e os resultados clínicos mostram que pode existir uma forte ligação entre as alterações clínicas relacionadas com a quantidade de fibras do sistema elástico. Embora haja grande limitação de dados onde não há definição do comportamento detrusor, tanto no número de espécimes, acreditasse um suposto envelhecimento precoce que pode ocorrer no tecido vesical assim como ocorre com a pele [27], o que justificaria as alterações encontradas através de uma provável redução de contratilidade detrusora. Mas para uma conclusão definitiva só será possível com a realização de estudos com avaliação da função contrátil vesical, que só pode ocorrer com o estudo urodinâmico completo.

6. CONCLUSÃO

O tabagismo altera a matriz extra-celular do colo vesical de pacientes submetidos à prostatectomia radical com aumento da quantidade fibras do sistema elástico ($P < 0,05$)

Ocorre também diminuição da altura da parede arterial neste mesmo grupo com correlação estatística ($P < 0,05$).

REFERÊNCIAS

1. Rodrigues Netto, N., Jr., et al., *Latin American study on patient acceptance of the International Prostate Symptom Score (IPSS) in the evaluation of symptomatic benign prostatic hyperplasia*. Urology, 1997. **49**(1): p. 46-9.
2. Ather, M.H. and A. Memon, *Uroflowmetry and evaluation of voiding disorders*. Tech Urol, 1998. **4**(3): p. 111-7.
3. Batty, G.D., et al., *Cigarette smoking and site-specific cancer mortality: testing uncertain associations using extended follow-up of the original Whitehall study*. Ann Oncol, 2008.
4. Sommer, F. and M.J. Mathers, *[Lifestyle, erectile dysfunction, hormones and metabolic syndrome. Opportunities for gender-specific prevention for men]*. Urologe A, 2007. **46**(6): p. 628-35.
5. Parsons, J.K., *Modifiable risk factors for benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms: new approaches to old problems*. J Urol, 2007. **178**(2): p. 395-401.
6. Boorjian, S., et al., *Bladder cancer incidence and risk factors in men with prostate cancer: results from Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor*. J Urol, 2007. **177**(3): p. 883-7; discussion 887-8.
7. Hanna, S.T., *Nicotine effect on cardiovascular system and ion channels*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(3): p. 348-58.
8. Polsky, J.Y., et al., *Smoking and other lifestyle factors in relation to erectile dysfunction*. BJU Int, 2005. **96**(9): p. 1355-9.
9. Hickey, K., K.A. Do, and A. Green, *Smoking and prostate cancer*. Epidemiol Rev, 2001. **23**(1): p. 115-25.
10. Borboroglu, P.G., et al., *Risk factors for vesicourethral anastomotic stricture after radical prostatectomy*. Urology, 2000. **56**(1): p. 96-100.
11. Shen, C.H., et al., *Inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism, cigarette smoking, and urothelial carcinoma risk*. Urology, 2007. **69**(5): p. 1001-6.
12. Rahman, M.M. and I. Laher, *Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms*. Curr Vasc Pharmacol, 2007. **5**(4): p. 276-92.
13. Lindenblatt, N., et al., *Distinct effects of acute and chronic nicotine application on microvascular thrombus formation and endothelial function in male and female mice*. Langenbecks Arch Surg, 2007. **392**(3): p. 285-95.
14. Stefanska, A.M. and P.T. Walsh, *Chronic obstructive pulmonary disease: evidence for an autoimmune component*. Cell Mol Immunol, 2009. **6**(2): p. 81-6.
15. Glader, P., et al., *Impact of acute exposure to tobacco smoke on gelatinases in the bronchoalveolar space*. Eur Respir J, 2008. **32**(3): p. 644-50.
16. Xu, J., et al., *Cigarette smoke-induced hypercapnic emphysema in C3H mice is associated with increases of macrophage metalloelastase and substance P in the lungs*. Exp Lung Res, 2007. **33**(5): p. 197-215.
17. Bartal, M., *COPD and tobacco smoke*. Monaldi Arch Chest Dis, 2005. **63**(4): p. 213-25.

18. Deshmukh, H.S., et al., *Matrix metalloproteinase-14 mediates a phenotypic shift in the airways to increase mucin production*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(9): p. 834-45.
19. Laitakari, J. and F. Stenback, *Collagen matrix in development and progression of experimentally induced respiratory neoplasms in the hamster*. Toxicol Pathol, 2001. **29**(5): p. 514-27.
20. Powell, J.T., et al., *Risk factors associated with the development of peripheral arterial disease in smokers: a case-control study*. Atherosclerosis, 1997. **129**(1): p. 41-8.
21. Kim, J.W., et al., *Acute and chronic effects of cigarette smoking on arterial stiffness*. Blood Press, 2005. **14**(2): p. 80-5.
22. Mack, W.J., et al., *Environmental tobacco smoke and carotid arterial stiffness*. Prev Med, 2003. **37**(2): p. 148-54.
23. Pratt, B. and J. Curci, *Arterial elastic fiber structure. Function and potential roles in acute aortic dissection*. J Cardiovasc Surg (Torino). **51**(5): p. 647-56.
24. Chung, A.W., et al., *Upregulation of matrix metalloproteinase-2 in the arterial vasculature contributes to stiffening and vasomotor dysfunction in patients with chronic kidney disease*. Circulation, 2009. **120**(9): p. 792-801.
25. Just, M., et al., *Effect of smoking on skin elastic fibres: morphometric and immunohistochemical analysis*. Br J Dermatol, 2007. **156**(1): p. 85-91.
26. Tanaka, H., et al., *Tobacco smoke extract induces premature skin aging in mouse*. J Dermatol Sci, 2007. **46**(1): p. 69-71.
27. Morita, A., *Tobacco smoke causes premature skin aging*. J Dermatol Sci, 2007. **48**(3): p. 169-75.
28. Szendroi, M., et al., *On the presence of a metalloprotease in human skin fibroblasts that degrades the human skin elastic fiber system*. J Invest Dermatol, 1984. **83**(3): p. 224-9.
29. Pinto, L.d.S. *Matriz Extracelular*. 2012 [cited; Available from: <http://www.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/4c36d82c7934583f6b895bd1ac809902.pdf?PHPS ESSID=6814f2bfc827eaf6856a71993cf0ca08>].
30. Reiter, E.R.D., J.B., *Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Editor. 2002, Saunders: Philadelphia, Pennsylvania, USA. p. Chapter 85.
31. Collin, S.M., et al., *Prostate-cancer mortality in the USA and UK in 1975-2004: an ecological study*. Lancet Oncol, 2008. **9**(5): p. 445-52.
32. Zequi, S.d.C. and R.S.M. Campos, *Câncer de Próstata Localizado*, in *Urologia Fundamental*, A.N. Júnior, M. Zerati Filho, and R.B. dos Reis, Editors. 2010, Planmark: São Paulo. p. 205-214.
33. Warren, J.L., et al., *Evaluation of Trends in the Cost of Initial Cancer Treatment*. J Natl Cancer Inst, 2008.
34. Walsh, P.C., *Radical retropubic prostatectomy with reduced morbidity: an anatomic approach*. NCI Monogr, 1988(7): p. 133-7.
35. Walsh, P.C., *Anatomic Radical Retropubic Prostatectomy*, in *Campbell's Urology*, P.C. Walsh, Editor. 2002, Saunders: Philadelphia, Pennsylvania, USA. p. Chapter 90.
36. Walsh, P.C., *Re: Anatomical radical retropubic prostatectomy: detailed description of the surgical technique*. J Urol, 2005. **173**(1): p. 324.

37. Elliott, S.P., et al., *Incidence of urethral stricture after primary treatment for prostate cancer: data From CaPSURE*. J Urol, 2007. **178**(2): p. 529-34; discussion 534.
38. Orvieto, M.A., et al., *Surgical modifications in bladder neck reconstruction and vesicourethral anastomosis during radical retropubic prostatectomy to reduce bladder neck contractures*. Can J Urol, 2006. **13**(6): p. 3353-7.
39. Moul, J.W., et al., *Preoperative and operative factors to predict incontinence, impotence and stricture after radical prostatectomy*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 1998. **1**(5): p. 242-249.
40. Kao, T.C., et al., *Multicenter patient self-reporting questionnaire on impotence, incontinence and stricture after radical prostatectomy*. J Urol, 2000. **163**(3): p. 858-64.
41. Licht, M.R., et al., *Impact of bladder neck preservation during radical prostatectomy on continence and cancer control*. Urology, 1994. **44**(6): p. 883-7.
42. Kamalov, A.A., et al., *[Quality of life in patients after radical prostatectomy]*. Urologiia, 2005(4): p. 27-9.
43. Besarani, D., P. Amoroso, and R. Kirby, *Bladder neck contracture after radical retropubic prostatectomy*. BJU Int, 2004. **94**(9): p. 1245-7.
44. Barreto, F., M. Dall'Oglio, and M. Srougi, *Recurrent vesicourethral stenosis after radical prostatectomy: how to treat it?* Int Braz J Urol, 2005. **31**(6): p. 552-4.
45. Selli, C., et al., *Role of bladder neck preservation in urinary continence following radical retropubic prostatectomy*. Scand J Urol Nephrol, 2004. **38**(1): p. 32-7.
46. Zhong, K.B., X.Z. Jiang, and C.Y. Peng, *[Uroflowmetry and its influence factors in benign prostate hyperplasia patients]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2005. **30**(1): p. 99-101, 120.
47. Porru, D., et al., *Home and office uroflowmetry for evaluation of LUTS from benign prostatic enlargement*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005. **8**(1): p. 45-9.
48. Wolters, R., et al., *Lower urinary tract symptoms: social influence is more important than symptoms in seeking medical care*. BJU Int, 2002. **90**(7): p. 655-61.
49. Porru, D., et al., *Relationship of flow rate with symptoms, quality of life and other clinical parameters in patients with LUTS suggestive of BPH*. Eur Urol, 2001. **40 Suppl 1**: p. 23-7.
50. Mandarim-de-Lacerda, C.A., *Stereological tools in biomedical research*. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 2003: p. 469-486.
51. Bancroft, J.D. and H.C. Cook, *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. 1994, Edinburgh: Churchill Livingstone.
52. Mandarim-de-Lacerda, C.A., *Métodos quantitativos em morfologia*. 1995, Rio de Janeiro: EdUERJ.
53. Mandarim-de-Lacerda, C.A., *Stereology In The Normal and Pathological Morphologic Research*. Biomed Research, 1998. **9**: p. 153-163.
54. Cruz-Orive, L.M. and E.R. Weibel, *Recent stereological methods for cell biology: a brief survey*. Am J Physiol, 1990. **258**(4 Pt 1): p. L148-56.
55. Royet, J.P., *Stereology: a method for analyzing images*. Prog Neurobiol, 1991. **37**(5): p. 433-74.

56. Yin, H., L. Chao, and J. Chao, *Nitric oxide mediates cardiac protection of tissue kallikrein by reducing inflammation and ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion*. Life Sci, 2008. **82**(3-4): p. 156-65.
57. Gullu, H., et al., *Light cigarette smoking impairs coronary microvascular functions as severely as smoking regular cigarettes*. Heart, 2007. **93**(10): p. 1274-7.
58. Raveendran, M., et al., *Cigarette suppresses the expression of P4Halpa and vascular collagen production*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(2): p. 592-8.
59. Chung, A.W., et al., *Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome*. Circ Res, 2007. **101**(5): p. 512-22.
60. Kirkham, P.A., et al., *Cigarette smoke triggers macrophage adhesion and activation: role of lipid peroxidation products and scavenger receptor*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(7): p. 697-710.
61. Yoshiyama, S., et al., *Effect of cigarette smoke components on vascular smooth muscle cell migration toward platelet-derived growth factor BB*. J Pharmacol Sci. **115**(4): p. 532-5.
62. Egleton, R.D., K.C. Brown, and P. Dasgupta, *Angiogenic activity of nicotinic acetylcholine receptors: implications in tobacco-related vascular diseases*. Pharmacol Ther, 2009. **121**(2): p. 205-23.
63. Ramos, C., et al., *Increase of matrix metalloproteinases in woodsmoke-induced lung emphysema in guinea pigs*. Inhal Toxicol, 2009. **21**(2): p. 119-32.
64. ten Brinke, A., *Risk factors associated with irreversible airflow limitation in asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(1): p. 63-9.
65. Carvalho, C.A., et al., *Morphological alterations in the prostate stroma of rats submitted to chronic nicotine treatment*. Microsc Res Tech. **75**(1): p. 46-53.

ANEXOS

ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PÓS-INFORMAÇÃO

Prezado _____ NIP: _____:

Esta pesquisa chama-se "ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CÓLO VESICAL DE PACIENTES SUBMETIDOS À PROSTATECTOMIA RADICAL POR CÂNCER DE PRÓSTATA"

A sua participação nesta pesquisa é livre, devendo assinar o termo de consentimento, apenas depois, que todas as dúvidas forem esclarecidas. É importante estar ciente das seguintes informações.

No presente estudo, estamos analisando alterações histológicas (microscópicas) do colo vesical em pacientes submetidos à prostatectomia radical (retirada completa da próstata e vesículas seminais) por apresentarem câncer da próstata. Temos como objetivo avaliar as possíveis alterações presentes no colo vesical (bexiga) em pacientes que possuem complicações cirúrgica em uma fase precoce do tratamento pós-operatório. Com resultados tentaremos diagnosticar precocemente as complicações cirúrgicas, podendo implementar o tratamento em uma fase inicial da doença, diminuindo os custos e melhorando a qualidade do tratamento específico.

O material retirado durante a cirurgia, possui dimensões muito pequenas, e portanto, em nenhum momento compromete seu tratamento ou resultado cirúrgico.

Informamos que, caso não queira participar da pesquisa, ou quiser retirar-se do estudo em qualquer fase, em nenhum momento esta decisão irá prejudicar a sua vida profissional, pessoal, ou seu tratamento.

Declaro estar ciente dos objetivos, métodos e procedimentos que serão realizados, sendo de livre vontade que participo e autorizo os pesquisadores a divulgarem os resultados obtidos.

Pesquisador

Nome do voluntário

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: Análise Morfológica do CóloVesical de Pacientes Submetidos à Prostatectomia Radical por Câncer de Próstata.

N.º do Protocolo: *a ser definido pelo CEP*

Investigador Principal: Leslie Clifford Noronha Araujo

Contato: Clínica de Urologia do Hospital Naval Marcílio Dias
Rua Cezar Zama, 185 2º andar- Rio de Janeiro – RJ Cep: 20725-090
Tel: 2599-5477

O Sr. está sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa sobre as alterações microscópicas apresentadas no colo vesical (bexiga) após a cirurgia radical para o câncer de próstata. Antes de o Sr decidir se quer ou não participar, deve ler as seguintes informações e fazer quantas perguntas forem necessárias para ter certeza que entendeu o que será realizado caso deseje participar. Se decidir participar, o Sr precisará assinar e datar este documento, recebendo uma cópia.

OBJETIVO: avaliar se alterações morfológicas (microscópicas) precoces que possam predizer ou justificar complicações pós-operatórias como a estenose de colo e a retenção urinária. Com seus resultados tentaremos melhorar a avliação pós-operatória e a instituição do tratamento específico, podendo diminuir o tempo de tratamento e complicações.

DESCRIÇÃO: aceitando participar o Sr. Terá um pequeno fragmento da sua bexiga analisado em um laboratório de avaliação microscópica situado no Departamento de Anatomia Humana (Unidade de Pesquisa Urogenital) da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). Neste local, este fragmento será processado por diversas técnicas de avaliação microscópica e será comparado com o fragmento de outros pacientes e os resultados serão analisados. Durante o estudo o Sr. poderá ser arguido sobre alguns detalhes de sua evolução clínica pelo pesquisador.

RISCOS E BENEFÍCIOS: esta pesquisa não oferece outros riscos àqueles associados ao procedimento normal. Caso haja qualquer suspeita de câncer no fragmento retirado para análise, este material será retirado do presente estudo e enviado ao Serviço de Anatomia Patológica para avaliação e para possível confirmação desta suspeita.

ASPECTOS FINANCEIROS/CUSTOS: não será cobrada nenhuma taxa durante qualquer fase da pesquisa.

SIGILO: sua identidade será mantida em segredo em todos os momentos .

PARTICIPAÇÃO E SAÍDA VOLUNTÁRIA: sua participação neste estudo é voluntária. Se o Sr iniciar o estudo, ainda terá o direito de sair em qualquer momento. Caso o Sr decida sair do estudo, esta decisão não trará nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais o Sr tem direito.

Não Assine este Termo de Consentimento, a menos que o Sr tenha tido a chance de esclarecer todas as suas dúvidas e tenha recebido respostas satisfatórias para suas perguntas.

ANEXO II: ARTIGO PUBLICADO

Open Journal of Urology, 2013, 3, 227-231

<http://dx.doi.org/10.4236/oju.2013.36043> Published Online October 2013 (<http://www.scirp.org/journal/oju>)



Bladder Neck Morphologic Changes and Clinical Correlation of Smokers Submitted to Radical Prostatectomy

L. C. N. Araujo^{1*}, W. S. Costa², F. O. Vilar¹, S. V. C. Lima¹, F. J. B. Sampaio²

¹Urology Department, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, PE, Brazil

²Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Email: *leslie.clifford@gmail.com

Received August 18, 2013; revised August 30, 2013; accepted September 5, 2013

Copyright © 2013 L. C. N. Araujo *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

Introduction: Smoking is an important risky factor to many diseases, affecting arterial system, skin and urogenital system, including bladder neck stenosis. Its effect on bladder neck has not been described. **Objective:** Evaluate possible morphological changes caused by nicotine in the bladder neck. **Material and Method:** Fragments of bladder neck of 16 patients were submitted to stereological analysis, and those patients are divided into two groups, one of smokers and the other of non-smokers with 7 and 9 patients, respectively. After 90 days of surgery, they were submitted to free uroflowmetry and data analyzed by T test, having statistical significance with $P < 0.05$. **Results:** An increase of 63.26% in the amount of fibers in the elastic system of the smokers group was observed, a reduction of 35.96% in the thickness of arteries, as well as an increase of IPSS and decrease of maximum flow in uroflowmetry, all with statistical significance. **Discussion:** Laboratorial changes are similar to those found in other studies with different tissues, such as skin, in which those findings are related to premature ageing. Clinical results, though statistically significant, do not have clinical consistence because the study was meant to morphological analysis. **Conclusion:** Smoking increases the amount of fibers in the elastic system and decreases the thickness of bladder neck arteries.

Keywords: Smoking; Bladder Neck; Elastic Fibers; Uroflowmetry

1. Introduction

Smoking has been described as an important risky factor to many diseases. It is closely linked to heart diseases, affecting directly the arterial system and microvasculature [1-4], and it also affects the distribution of extracellular matrix related to early ageing of these tissues [5-7]. In urogenital tract, it is linked to the development of bladder and prostate cancers and erectile dysfunction. Epidemiologically, it is a risky factor to bladder neck sclerosis following radical prostatectomy [1,8-14].

Morphological evaluation of bladder neck of smokers, as well as its clinical repercussions, has not been described yet.

2. Objective

The aim of this study is to analyze the possible morphological bladder neck changes of smokers and non-smok-

ers submitted to radical prostatectomy and compare those findings with laboratorial and clinical data obtained.

3. Material and Method

The Project was submitted to the Ethics Committee of the involved institution. Patients signed the form of free and duly informed consent. The calculus of the number of elements in the sample was done through standard deviation and margin of error, considering $P < 0.05$, and then obtaining the number of cases necessary to the comparison of two groups of patients, that had the amount of 6.65 for all parameters in each group.

Sixteen patients were selected, ages 62 to 69, all Navy military retirees and residents in Rio de Janeiro without prior prostate disease or vascular co-morbidities, which were undergone to radical prostatectomy. During the surgery fragments were taken from this group of patients, measuring approximately 1 cm, from the anterior surface of the bladder neck. The collection of material was done

*Corresponding author.

after the prostate and the seminal vesicles were removed and before vesicourethral anastomosis. Those patients were split in two groups, smokers (7 patients) and non-smokers (9 patients).

Patients that had surgical vesicle margin positive to oncological impairment or those submitted to radiotherapy as therapeutic complementation were excluded from the sample.

The material obtained was fixed in formalin solution (pH 7.2) and processed according to the histological routine stages to inclusion in paraffin. The material was cut with a width of 5 μ m.

The sections were stained by the following techniques: hematoxylin and eosin to tissue integrity analysis and arterial wall width measurement; oxidized Weigert's resorcin-fuchsin to characterize elastic system fibers and Van Gieson's to analyze collagen fibers and smooth muscle cells. After histologic routine procedures, sections were photographed in microscopic computerized system, composed of optical microscope and camera (Olympus®).

The quantification of different elements analyzed was done using ImageJ® program (Image Processing and Analysis in Java).

All patients were clinically followed-up for 180 days after surgery, filling up IPSS questionnaire (*International Prostate Score Symptoms*) [15] and were submitted to free uroflowmetry tests.

Results obtained were analyzed by statistical program GraphPad Prism 4, through unpaired two-tailed Student's T test, as well as through Pearson correlation analysis between gross amount results with calculus via confidence interval. Results were considered significant when $P < 0.05$.

4. Results

All data assumed normal distribution and the following results were obtained: in the smokers' group the amount of collagen fibers was 22.70% (SD = 4.86), elastic system fibers 13.29% (DP = 3.84) (Figure 1), smooth muscle 23.97% (SD = 12.3), height of arterial wall was 16.52 μ m (SD = 2.73) (Figure 2), while in the non-smoker's group was 21.20% (SD = 8.21) to collagen fibers, 8.14% (SD = 3.54) to elastic system fibers, 23.97% (SD = 8.01) (Figure 3) to smooth muscle fibers and 25.80 μ m (SD = 7.18) to height of arterial wall (Figure 4).

As for the parameters of clinical analysis, smokers' IPSS had an average of 18.40 (SD = 5.58), and non-smokers' was 9.39 (SD = 3.73), maximum flow obtained in free uroflowmetry (Qmax) had an average of 4.80 ml/s (DP = 1.72), and 9.60 ml/s (SD = 3.20) for non-smokers.

Statistical analysis showed that the increase in the amount of collagen fibers and the decrease of smooth muscle fibers had no statistical significance ($P > 0.05$). However the increase of the amount of elastic system

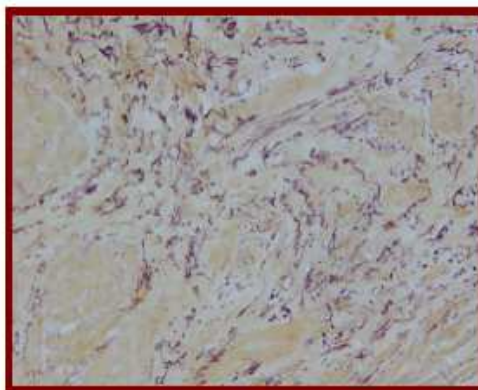


Figure 1. Photomicrography smoker group Weigert's resorcin-fuchsin, 400 $\times$.

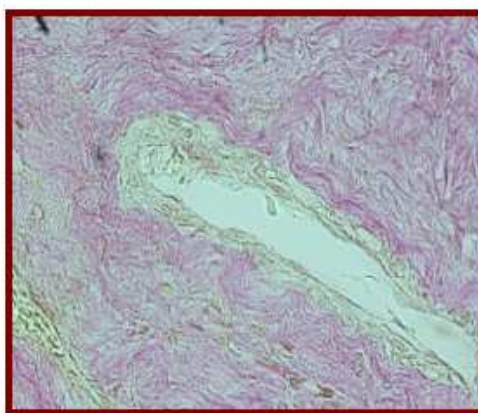


Figure 2. Arterial Wall, smoker Group, Van Gieson, 400 $\times$.

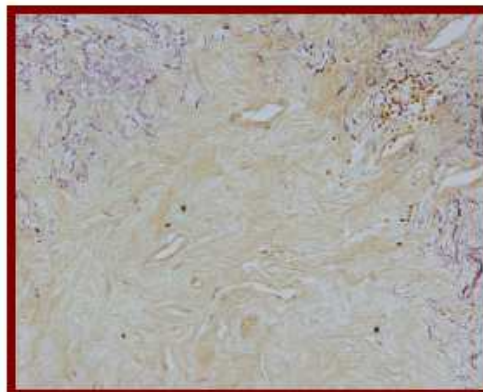


Figure 3. Photomicrography nonsmoker group Weigert's resorcin-fuchsin, 400 $\times$.

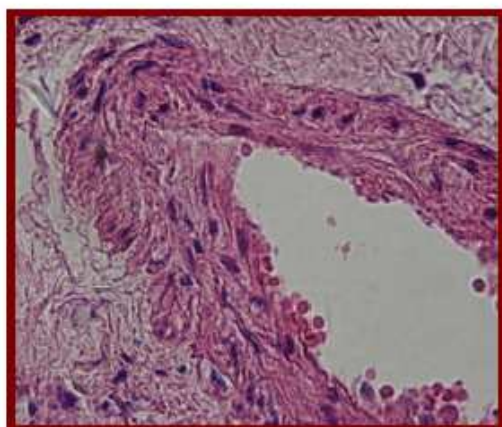


Figure 4. Arterial Wall, non-smoker Group, H & E, 400 $\times$.

fibers and the decrease of height of arterial wall in the same group had $P < 0.05$.

Through clinical analysis it was perceived increase of IPSS and decrease of Qmax, both with statistical significance ($P < 0.05$), in the smokers group.

Correlation analysis showed $R = -0.67$ ($P < 0.05$) between the amount of elastic system fibers and height of arterial wall, $R = 0.55$ ($P < 0.05$) between amount of elastic system fibers and IPSS, $R = -0.54$ ($P < 0.05$) between elastic system fibers and Qmax, $R = -0.59$ between height of arterial wall and IPSS, $R = 0.47$ ($P = 0.06$) between height of arterial wall and Qmax, and $R = -0.94$ ($P < 0.05$) between IPSS and Qmax.

Four patients in each group developed cardiovascular diseases, but no statistical difference was found when compared with the averages of the group that did not developed obstructive pathology.

Numerical results of different parameters can be seen on Tables 1 to 3.

5. Discussion

Effects of tobacco consumption on bladder neck circulation had not been previously characterized in literature. Borboroglu in 2000 evaluated patients that had sclerosis of bladder neck anastomosis among those risky factor groups: chronic obstructive lung disease (COLD), coronary arterial disease (CAD), Diabetes Mellitus (DM), smoking, pre-operative blood loss, surgical time and previous history of transurethral prostate resection (TURP) and concluded that smoking is an important factor to the development of sclerosis of bladder neck anastomosis, suggesting that it is originated from micro vascular changes [10]. Mack *et al.* (2003) observed a decrease of thickness of carotid artery as consequence of chronic use of nicotine [4].

Table 1. Morphometry of smooth muscle collagen, elastic system fibers and width of arterial wall—average $\pm$ standard deviation. Arterial wall width in μm .

	smoking	non-smoking	P
Collagen %	22.70 $\pm$ 4.86	21.20 $\pm$ 8.21	0.904
Smooth Muscle %	23.97 $\pm$ 12.31	27.97 $\pm$ 8.02	0.338
Elastic Fiber %	13.29 $\pm$ 3.85	8.14 $\pm$ 3.54	0.020
Arterial Wall (μm)	16.52 $\pm$ 2.73	25.80 $\pm$ 7.19	0.005

Table 2. Clinical analysis. IPSS (International Prostate Score Symptoms) and Qmax (maximum flow).

	smoking	non-smoking	P
IPSS	18.40 $\pm$ 5.59	9.67 $\pm$ 3.73	0.004
Qmax	4.80 $\pm$ 4.72	9.45 $\pm$ 3.20	0.040

Table 3. Analysis of Pearson correlation. Morphometry and Clinical Analysis. International Prostate Score Symptoms (IPSS); Free Uroflowmetry (Qmax).

Pearson Correlation	R	P
Elastic X Arterial Wall	-0.67	<0.05
Elastic X IPSS	0.55	<0.05
Elastic X Qmax	-0.52	<0.05
Arterial Wall X IPSS	-0.57	<0.05
Arterial Wall X Qmax	0.44	>0.05 ($p = 0.06$)

In this study, there were no findings of significant differences between the two groups when compared the amount of collagen and smooth muscle fibers. The reports of changes in synthesis and deposit of collagen from instillation of 7H-dibenzol (c, g) carbazole, that is a component of tobacco, represent specific changes of the respiratory tract, trachea and bronchi, in progressive neoplasia during the process of tumoral induction [16]. In this case tobacco action is not direct and, therefore, the effects are presented in a different way of those found in lungs, which explains conflicting results with previous studies.

The decrease of bladder neck arterial wall thickness in 35.96% (Figures 3 and 4) is conformed to literature, in which nicotine consumption is risky factor to atherosclerosis, thrombosis, tissue injury, superoxide ions and free radicals formation, reducing production and availability of Nitric Oxide, increasing the production of endothelin, leading to endothelial dysfunction, thrombosis, atherosclerosis and other endothelial diseases [3,17,18], decreasing elasticity of large arteries [4,17,19], with consequent organization disturbances, stiffness, calcification and vasomotor dysfunction [20], which are directly related to decrease of tissue oxygenation [21]. Even though Raveendran *et al.*, 2004, have related these changes to collagen metabolism [22], our results indicate that there is a change in elastic system fibers metabolism through

changes in the production and metabolism of metalloproteinase [5,6], confirmed by statistical correlation between thickness and amount of bladder neck elastic fibers (Table 3).

In vitro studies indicate that tobacco consumption prevents collagen production and increases tropoelastin production and activation of metalloproteinase, causing a degradation of matrix proteins and an abnormal production of elastic material, in its morphology and amount, having as a consequence the increase of the number of elastic system fibers in the skin [4-6]. In our results we have seen an increase of 62.36% of elastic system fibers in bladder neck tissue in smokers group when compared to non-smokers (Figures 1 and 2). Morita, associated these findings to early skin ageing [6].

Effect of smoking on the arterial system and consequent formation of elastic system fibers may not be limited to bladder neck, being distributed in all bladder, with an increase of elastic system fibers in all bladder wall and its repercussions, being able to cause early ageing, but there are no ways of getting definitive conclusions, once there are no previous data in the literature on bladder ageing.

Notwithstanding the results in clinical data have been statistically significant, they should be viewed with restrictions mainly by the number of participants and the absence of data related to detrusor function provided by uroflowmetry, once the study design was not meant to morphological evaluation only, and as such there are no previous data of bladder function in smokers. Gathered data may be, in spite of statistical significance, a coincidence, and are necessary future clinical studies to confirm the present findings. Results will be discussed only in order to be compared to further.

Results found on clinical data supposedly indicated an impact related to tobacco consumption both in IPSS result, with an increase of approximately 93%, as in Qmax reduction, with a decrease of about 51%, which was reflected in a reduction of voiding function statistically significant in smokers when compared to those that were not exposed to nicotine.

Correlation analysis between quantitative data and clinical results shows that there can be a strong connection between clinical changes related to amount of elastic system fibers. Even though there is a great limitation of data, which leads to absence of definitions regarding detrusor behavior, as for number of specimens, there should be a supposed early ageing that can happen to bladder tissue as well as skin [6], which should explain the changes that were found, with a probable reduction in detrusor contractility, as results are related to smoking and not with existence of cardiovascular diseases. But stating a definitive conclusion will only be possible with studies that evaluate detrusor function.

6. Conclusions

In the present study, smoking modified bladder neck extra-cell matrix of patients submitted to radical prostatectomy with an increase of the amount of elastic system fibers ($P < 0.05$).

It is also observed a decrease of arterial wall height in the same group with statistical correlation ($P < 0.05$).

REFERENCES

- [1] S. T. Hanna, "Nicotine Effect on Cardiovascular System and Ion Channels," *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, Vol. 47, No. 3, 2006, pp. 348-358.
- [2] U. John, S. E. Baumeister, C. Kessler and H. Volzke, "Associations of Carotid Intima-Media Thickness, Tobacco Smoking and Overweight with Hearing Disorder in a General Population Sample," *Atherosclerosis*, Vol. 195, No. 1, 2007, pp. e144-e149.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.007>
- [3] N. Lindenblatt, U. Platz, J. Hameister, E. Klar, M.D. Menger and B. Vollmar, "Distinct Effects of Acute and Chronic Nicotine Application on Microvascular Thrombus Formation and Endothelial Function in Male and Female Mice," *Langenbeck's Archives of Surgery*, Vol. 392, No. 3, 2007, pp. 285-295.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00423-007-0173-6>
- [4] W. J. Mack, T. Islam, Z. R. H. Lee, Selzer, et al., "Environmental Tobacco Smoke and Carotid Arterial Stiffness," *Preventive Medicine*, Vol. 37, No. 2, 2003, pp. 148-154.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0091-7435\(03\)00097-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-7435(03)00097-5)
- [5] M. Just, Ribera, M. Monso, E. Lorenzo, J. C. Lorenzo and C. Ferrándiz, "Effect of Smoking on Skin Elastic Fibres: Morphometric and Immunohistochemical Analysis," *British Journal of Dermatology*, Vol. 156, No. 1, 2007, pp. 85-91.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07575.x>
- [6] A. Morita, "Tobacco Smoke Causes Premature Skin Aging," *Journal of Dermatological Science*, Vol. 48, No. 3, 2007, pp. 169-175.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.06.015>
- [7] H. Tanaka, Y. Ono, Y. Nakata, N. Shintani, et al., "Tobacco Smoke Extract Induces Premature Skin Aging in Mouse," *Journal of Dermatological Science*, Vol. 46, No. 1, 2007, pp. 69-71.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.11.009>
- [8] G. D. Batty, M. Kivimaki, G. D. Gray, M. G. Smith, et al., "Cigarette Smoking and Site-Specific Cancer Mortality: Testing Uncertain Associations Using Extended Follow-up of the Original Whitehall Study," *Annals of Oncology*, Vol. 191, No. 5, 2008, pp. 996-1002.
- [9] S. Boorjian, J. E. Cowan, B. R. Konety, J. DuChane, et al., "Bladder Cancer Incidence and Risk Factors in Men with Prostate Cancer: Results from Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor," *Journal of Urology*, Vol. 177, No. 3, 2007, pp. 883-887.
- [10] P. G. Borboroglu, J. P. Sands, J. L. Roberts and C. L.

- Amling, "Risk Factors for Vesicourethral Anastomotic Stricture after Radical Prostatectomy," *Urology*, Vol. 56, No. 1, 2000, pp. 96-100.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0090-4295\(00\)00556-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00556-2)
- [11] K. Hickey, K.-A. Do and A. Green, "Smoking and Prostate Cancer," *Epidemiologic Reviews*, Vol. 23, No. 1, 2001, pp. 115-125.
<http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a000776>
- [12] J. K. Parsons, "Modifiable Risk Factors for Benign Prostatic Hyperplasia and Lower Urinary Tract Symptoms: New Approaches to Old Problems," *Journal of Urology*, Vol. 178, No. 2, 2007, pp. 395-401.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2007.03.103>
- [13] J. Y. Polsky, K. J. Aronson, J. P. W. Heaton and M. A. Adams, "Smoking and Other Lifestyle Factors in Relation to Erectile Dysfunction," *BJU International*, Vol. 96, No. 9, 2005, pp. 1355-1359.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05820.x>
- [14] F. Sommer and M. J. Mathers, "Lifestyle, Erectile Dysfunction, Hormones and Metabolic Syndrome. Opportunities for Gender-Specific Prevention for Men," *Urology*, Vol. 46, No. 6, 2007, pp. 628-635.
- [15] N. Rodrigues Netto, M. L. de Lima, E. F. M. de Andrade, F. Apuzzo, et al., "Latin American Study on Patient Acceptance of the International Prostate Symptom Score (IPSS) in the Evaluation of Symptomatic Benign Prostatic Hyperplasia," *Urology*, Vol. 49, No. 1, 1997, pp. 46-49.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0090-4295\(96\)00372-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0090-4295(96)00372-X)
- [16] J. Laitakari and F. Stenback, "Collagen Matrix in Development and Progression of Experimentally Induced Respiratory Neoplasms in the Hamster," *Journal of Toxicologic Pathology*, Vol. 29, No. 5, 2001, pp. 514-527.
<http://dx.doi.org/10.1080/019262301317226311>
- [17] M. M. Rahman and I. Laher, "Structural and Functional Alteration of Blood Vessels Caused by Cigarette Smoking: An Overview of Molecular Mechanisms," *Current Vascular Pharmacology*, Vol. 5, No. 4, 2007, pp. 276-292.
<http://dx.doi.org/10.2174/157016107782023406>
- [18] C.-W. Shen, Y.-H. Wang, Y.-C. Jou, et al., "Inducible Nitric Oxide Synthase Promoter Polymorphism, Cigarette Smoking, and Urothelial Carcinoma Risk," *Urology*, Vol. 69, No. 5, 2007, pp. 1001-1006.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2007.02.028>
- [19] H. Yin, L. Chao and J. Chao, "Nitric Oxide Mediates Cardiac Protection of Tissue Kallikrein by Reducing Inflammation and Ventricular Remodeling after Myocardial Ischemia/Reperfusion," *Life Sciences*, Vol. 82, No. 3-4, 2008, pp. 156-165.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2007.10.021>
- [20] A. W. Y. Chung, H. H. C. Yang, J. M. Kim, M. K. Sigris, et al., "Upregulation of Matrix Metalloproteinase-2 in the Arterial Vasculature Contributes to Stiffening and Vasomotor Dysfunction in Patients with Chronic Kidney Disease," *Circulation*, Vol. 120, No. 9, 2009, pp. 792-801.
<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.862565>
- [21] H. Gullu, M. Caliskan, O. Ciftci, D. Erdogan, et al., "Light Cigarette Smoking Impairs Coronary Microvascular Functions as Severely as Smoking Regular Cigarettes," *Heart*, Vol. 93, No. 10, 2007, pp. 1274-1277.
<http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2006.100255>
- [22] M. Raveendran, D. Senthil, B. Utama, Y. Shen, et al., "Cigarette Suppresses the Expression of P4Halp and Vascular Collagen Production," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 323, No. 2, 2004, pp. 592-598.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.129>