UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

ANA MARIA MILANEZ AZEVEDO

**Marcadores de resposta ao sildenafil no tratamento
da disfunção erétil: genes relacionados à
dimetilarginina assimétrica**

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

ANA MARIA MILANEZ AZEVEDO

**Marcadores de resposta ao sildenafil no tratamento
da disfunção erétil: genes relacionados à
dimetilarginina assimétrica**

Ribeirão Preto
2017

ANA MARIA MILANEZ AZEVEDO

**Marcadores de resposta ao sildenafil no tratamento da disfunção erétil: genes
relacionados à dimetilarginina assimétrica**

**“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca
da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Riccardo Lacchini

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Azevedo, Ana Maria Milanez

Marcadores de resposta ao sildenafil no tratamento da disfunção erétil: genes relacionados à dimetilarginina assimétrica. Ribeirão Preto, 2017.

139 f. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Lacchini, Riccardo.

1. Disfunção erétil. 2. Dimetilarginina assimétrica. 3. Sildenafil. 4. Polimorfismos genéticos. 5. Farmacogenética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AZEVEDO, A. M. M. **Marcadores de resposta ao sildenafil no tratamento da disfunção erétil: genes relacionados à dimetilarginina assimétrica.** 139 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a minha mãe, Regina,
minhas avós, Leila e Alayde, minhas
irmãs, Mayara e Marina, e ao meu noivo,
Renato, que sempre me apoiaram e
demonstraram seu amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha mãe Regina, e ao meu noivo, Renato, pelo amor imensurável, carinho e pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Riccardo Lacchini pelos ensinamentos, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e por me aconselhar sobre a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos por fornecer gentilmente materiais e equipamentos necessários para realização deste trabalho, e ao pessoal de seu laboratório por toda ajuda sempre que preciso.

À colaboradora Vanessa de Almeida Belo por sua contribuição nas análises de regressão linear e logística multivariadas.

Ao Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli por permitir a leitura dos géis de eletroforese em seu laboratório, e aos seus alunos pela ajuda e companheirismo.

Aos colegas de laboratório Fernanda, Guilherme, Letícia, Jordana, Anderson, Martyella e Aline, pela parceria durante este período, pelos trabalhos realizados juntos e pelas risadas nos momentos de descontração.

Aos membros das Bancas de Qualificação e de Defesa pela contribuição neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A Deus, por me dar forças em todos os dias de minha vida e iluminar o meu caminho.

RESUMO

AZEVEDO, A. M. M. **Marcadores de resposta ao sildenafil no tratamento da disfunção erétil: genes relacionados à dimetilarginina assimétrica**. 2017. 139 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A disfunção erétil (DE) é uma doença relacionada com a sinalização deficiente de óxido nítrico (NO). O NO é produzido a partir da L-arginina pelas enzimas óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS). A dimetilarginina assimétrica (ADMA) é um inibidor endógeno dos três subtipos existentes de NOS, e é metabolizada principalmente pelas enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1 e 2 (DDAH1 e DDAH2). Vários estudos têm associado alterações em genes, expressão ou atividade das enzimas DDAH com distúrbios em que a sinalização de NO é prejudicada. O objetivo deste estudo foi avaliar se o nível de resposta ao tratamento da DE com sildenafil pode estar associado a polimorfismos dos genes *DDAH1* (rs1554597 e rs18582) e *DDAH2* (rs805304 e rs805305) e, também, aos haplótipos formados por estes polimorfismos. Foram selecionados 70 pacientes com DE pós-prostatectomia (DEPP) e 70 pacientes com DE clínica (DEC). A função erétil dos voluntários foi avaliada através do questionário Índice Internacional de Função Erétil (IIEF). Para avaliação da resposta ao sildenafil, foram calculadas a diferença entre as pontuações pré e pós-tratamento (Δ IIEF) e a percentagem atingida da máxima resposta possível (Δ IIEF%) de cada paciente. Também, os pacientes de cada grupo foram divididos em bons e maus respondedores ao sildenafil de acordo com a mediana dos valores de Δ IIEF%. Os genótipos dos rs1554597, rs805304 e rs805305 foram obtidos pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática, e do

rs18582 pela técnica de PCR alelo específica. O *software* PHASE 2.1 foi utilizado para estimar os haplótipos em cada grupo. Os resultados mostraram que o alelo variante A do rs18582 apresentou tendência para associação com piores respostas ao sildenafil no grupo DEC ($P=0,058$). No grupo DEPP, portadores dos alelos variantes A do rs805304 e G do rs805305 foram associados a melhores respostas ao sildenafil (Δ IIEF, $P=0,007$; Δ IIEF%, $P=0,025$; e *score* IIEF pós-tratamento, $P=0,014$). Não foram encontradas outras associações significativas. Estes resultados mostram que os marcadores genéticos rs805304 e rs805305 do *DDAH2* podem influenciar as respostas ao sildenafil em pacientes com DE.

Palavras-chave: Disfunção erétil. Dimetilarginina assimétrica. Sildenafil. Polimorfismos genéticos. Farmacogenética.

ABSTRACT

AZEVEDO, A. M. M. **Markers of sildenafil responsiveness in the treatment of erectile dysfunction: asymmetric dimethylarginine related genes.** 2017. 139 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Erectile dysfunction (ED) is a disease related to deficient nitric oxide (NO) signaling. NO is produced from L-arginine by three isoforms of the enzyme nitric oxide synthase: neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and induced (iNOS). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of the three existing NOS subtypes, and is metabolized primarily by dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 and 2 (DDAH1 and DDAH2) enzymes. Several studies have associated changes in genes, expression or activity of DDAH enzymes with disorders in which NO signaling is impaired. The aim of this study was to evaluate whether the response to ED treatment with sildenafil may be associated with polymorphisms of the *DDAH1* (rs1554597 and rs18582) and *DDAH2* genes (rs805304 and rs805305), as well as the haplotypes formed by these polymorphisms. We selected 70 patients with post-prostatectomy ED (PPED) and 70 patients with clinical ED (CED). The erectile function of the volunteers was assessed using the International Index for Erectile Function (IIEF) questionnaire. To evaluate the response to sildenafil, the difference between the pre- and post-treatment scores (Δ IIEF) and the percentage reached from the maximum possible response (Δ IIEF%) of each patient were calculated. Also, patients from each group were divided into good and bad responders to sildenafil according to the median values of Δ IIEF%. The genotypes of rs1554597, rs805304 and rs805305 were obtained by the polymerase chain reaction (PCR) technique followed by enzymatic digestion, and rs18582 by the allele-specific PCR technique.

The PHASE 2.1 software was used to estimate the haplotypes in each group. The results showed that the variant A allele of rs18582 showed a tendency to be associated with a greater chance of worse responses to sildenafil in the DEC group ($P=0,058$). In the DEPP group, carriers of the variant alleles A of rs805304 and G of rs805305 were associated with better responses to sildenafil (Δ IIEF, $P=0,007$; Δ IIEF%, $P=0,025$; and post-treatment IIEF score, $P=0,014$). No other significant associations were found. These results show that the genetic markers rs805304 and rs805305 of *DDAH2* may influence the responses to sildenafil in patients with ED.

Keywords: Erectile dysfunction. Asymmetric dimethylarginine. Sildenafil, Genetic polymorphisms. Pharmacogenetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fisiologia da ereção peniana.....	22
Figura 2 – Arginina e suas formas metiladas.....	26
Figura 3 – Mapa do gene <i>DDAH2</i>	32
Figura 4 – Avaliação da resposta ao sildenafil	45
Figura 5 – Genotipagem do rs1554597	51
Figura 6 – Genotipagem do rs18582.....	53
Figura 7 – Genotipagem do rs805304.....	55
Figura 8 – Genotipagem do rs805305.....	58
Figura 9 – Δ IIEF x genótipos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH1</i>	69
Figura 10 – Δ IIEF x genótipos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH2</i>	69
Figura 11 – Δ IIEF x alelos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH1</i>	70
Figura 12 – Δ IIEF x alelos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH2</i>	70
Figura 13 – Δ IIEF x haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i>	71
Figura 14 – Δ IIEF% x genótipos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH1</i>	72
Figura 15 – Δ IIEF% x genótipos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH2</i>	72
Figura 16 – Δ IIEF% x alelos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH1</i>	73
Figura 17 – Δ IIEF% x alelos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH2</i>	73
Figura 18 – Δ IIEF% x haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i>	74
Figura 19 – Score IIEF pós-tratamento x genótipos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH1</i>	75
Figura 20 – Score IIEF pós-tratamento x genótipos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH2</i>	75
Figura 21 – Score IIEF pós-tratamento x alelos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH1</i>	76
Figura 22 – Score IIEF pós-tratamento x alelos dos polimorfismos estudados do gene <i>DDAH2</i>	76
Figura 23 – Score IIEF pós-tratamento x haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i>	77
Figura 24 – Resumo dos principais resultados obtidos.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do grau de DE segundo a pontuação no domínio função erétil do questionário IIEF.....	20
Tabela 2 – Evidências clínicas e funcionais dos polimorfismos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> selecionados para o estudo	34
Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados.....	63
Tabela 4 – Características clínicas e laboratoriais de bons e maus respondedores em cada grupo.....	64
Tabela 5 – Principais medicações utilizadas pelos pacientes.....	65
Tabela 6 – Frequências dos genótipos nos grupos DEPP e DEC	66
Tabela 7 – Frequências dos alelos nos grupos DEPP e DEC	67
Tabela 8 – Frequências estimadas dos haplótipos nos grupos DEPP e DEC	68
Tabela 9 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE pós-prostatectomia.....	79
Tabela 10 – Distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE pós-prostatectomia.....	80
Tabela 11 – Distribuição dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE pós-prostatectomia	81
Tabela 12 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE clínica	82
Tabela 13 – Distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE clínica.....	83
Tabela 14 – Distribuição dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE clínica.....	84
Tabela 15 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e <i>score</i> IIEF pós-tratamento no grupo DEPP	86
Tabela 16 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos alelos dos polimorfismos estudados sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e <i>score</i> IIEF pós-tratamento no grupo DEPP	88
Tabela 17 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e <i>score</i> IIEF pós-tratamento no grupo DEPP.....	90

Tabela 18 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEC.....	92
Tabela 19 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos alelos dos polimorfismos estudados sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEC.....	94
Tabela 20 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEC.....	96
Tabela 21 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEPP.....	99
Tabela 22 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEPP.....	100
Tabela 23 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEPP.....	101
Tabela 24 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEC.....	102
Tabela 25 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEC.....	103
Tabela 26 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEC.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA – dimetilarginina assimétrica

Ang II – angiotensina II

BR – bons respondedores

DDAH – enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolase

DDAH1 – enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolase tipo 1

DDAH2 – enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolase tipo 2

DE – disfunção erétil

DEC – disfunção erétil clínica

DEPP – disfunção erétil pós-prostatectomia

DM – Diabetes mellitus

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – *deoxynucleotide solution mix*

EDTA – ácido etileno diamino tetra acético

EROs – espécies reativas de oxigênio

eNOS – enzima óxido nítrico sintase endotelial

FE – função erétil

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

HCFMRP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HDL – lipoproteína de alta densidade

IC – intervalo de confiança

IIEF – *International Index for Erectile Function*

IL-1 β – interleucina-1 beta

iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzível

iPDE-5 – inibidor da fosfodiesterase tipo 5

LD – *Linkage Disequilibrium*

LDL – lipoproteína de baixa densidade

L-NAME – *N^G-nitro-L-arginine methyl ester*

L-NMMA – monometilarginina

LPS – lipopolissacarídeos bacterianos

MAF – *minor allele frequency*

MPR – máxima resposta possível

MR – maus respondedores

NADPHox – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase

NANC – não adrenérgicas/não colinérgicas

NO – óxido nítrico

NOS – enzima óxido nítrico sintase

nNOS – enzima óxido nítrico sintase neuronal

OR – *odds ratio*

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDE-5 – enzima fosfodiesterase tipo 5

pO₂ – pressão de oxigênio

PRMTs – *protein arginine methyltransferases*

p22phox – *cytochrome b-245 alpha chain*

score IIEF – pontuação no domínio função erétil do IIEF

SDMA – dimetilarginina simétrica

SNP – *single nucleotide polymorphism*

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

Δ IIEF – diferença entre as pontuações pré e pós-tratamento com sildenafil no IIEF

Δ IIEF% – percentagem da máxima resposta possível atingida pelo paciente

Teste χ^2 – teste do qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Generalidades sobre a disfunção erétil.....	18
1.1.1 <i>O International Index for Erectile Function.....</i>	<i>19</i>
1.2 O óxido nítrico e a disfunção erétil.....	20
1.2.1 Fisiologia da função erétil.....	20
1.2.2 Fisiopatologia da DE.....	23
1.3 A dimetilarginina assimétrica.....	25
1.3.1 As enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1 e 2.....	27
1.3.2 As enzimas DDAH1 e DDAH2 e a disfunção erétil.....	28
1.3.3 Relevância de polimorfismos genéticos nos genes DDAH1 e DDAH2.....	31
1.4 Tratamento da disfunção erétil com sildenafil.....	35
1.4.1 Marcadores genéticos e bioquímicos podem alterar a resposta ao tratamento com sildenafil.....	37
2. HIPÓTESE.....	38
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	43
4.1 Seleção dos participantes.....	43
4.2 Avaliação da função erétil e da resposta ao tratamento com sildenafil.....	44
4.3 Análises laboratoriais.....	45

4.4 Extração de DNA genômico.....	46
4.5 Genotipagens.....	47
4.5.1 rs1554597 do gene DDAH1 (T/C).....	50
4.5.2 rs18582 do gene DDAH1 (G/A).....	51
4.5.3 rs805304 do gene DDAH2 (C/A).....	54
4.5.4 rs805305 do gene DDAH2 (C/G).....	55
4.6 Análises estatísticas e inferência de haplótipos.....	58
5. RESULTADOS.....	60
6. DISCUSSÃO.....	105
6.1	116
7. CONCLUSÃO.....	117
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXOS.....	130

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades sobre a disfunção erétil

Segundo o Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano, a disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade persistente de obter ou manter uma ereção peniana suficiente para permitir uma relação sexual satisfatória.¹

A prevalência de DE varia de 2–9% em homens com idade entre 40 e 49 anos, que aumenta para 20–40% em homens com idade entre 60 e 69 anos, e pode variar de 50–100% naqueles com mais de 70 anos.^{2; 3} Um estudo de grande relevância, o *Massachusetts Male Aging Study*, apontou que a incidência geral de disfunção erétil foi de 26 casos/1000 homens por ano, número que aumentou com a idade, atingindo 46 casos/1000 homens por ano para pacientes entre 60 e 69 anos.⁴ Além disso, com o aumento da esperança de vida que vem ocorrendo em muitos países, a prevalência mundial da DE deve atingir 322 milhões de casos até o ano de 2025.⁵

A DE é classificada como psicogênica, orgânica (neurogênica, endocrinológica, vasculogênica, cavernosa ou induzida por drogas), ou mista (isto é, psicogênica e orgânica).^{3; 6} Entre as causas orgânicas destacam-se as doenças vasculares como sendo responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de DE.⁷ A disfunção erétil de origem vasculogênica pode ser causada por disfunção endotelial⁸ e compartilha diversos fatores de risco com doenças cardiovasculares.⁹ De fato, doenças vasculares e DE geralmente coexistem¹⁰ e a DE é atualmente considerada um marcador para identificar determinadas doenças cardiovasculares silenciosas, como doença arterial coronariana.^{7; 9} A incidência de doença

coronariana e de doença vascular periférica é maior em homens que apresentam DE.⁶ Além disso, estudos mostram que os riscos da ocorrência de infarto do miocárdio e de acidente vascular cerebral encontram-se aumentados em homens que apresentam alguns sintomas cardíacos e que possuem anomalias vasculares penianas.⁶

Diabetes mellitus (DM), síndrome metabólica, uso de tabaco, disfunções endócrinas como hipogonadismo, hiperplasia benigna da próstata, hipertensão arterial entre outros podem ser considerados fatores de risco para DE.¹¹ Além disso, algumas classes de medicamentos prescritos rotineiramente (diuréticos, anti-hipertensivos, antidepressivos, antagonistas de receptores de histamina tipo 2, entre outras) podem estar associadas com o surgimento de DE.¹¹

1.1.1 O *International Index for Erectile Function*

O *International Index for Erectile Function* (IIEF) ou Índice Internacional de Função Erétil é um questionário composto por 15 questões, agrupadas em cinco domínios (função erétil, função orgástica, desejo sexual, satisfação no intercurso e satisfação geral), que foi desenvolvido com o objetivo de criar uma medida curta, confiável e auto administrável da função erétil, que fosse culturalmente válida e psicometricamente sólida, com a sensibilidade e especificidade para a detecção de alterações relacionadas ao tratamento em pacientes com disfunção erétil. Cada domínio tem uma pontuação final que é obtida pela soma das questões, cujos valores variam de 1 a 5 pontos cada. Menores pontuações nos domínios do IIEF indicam uma baixa qualidade de vida sexual.^{12; 13}

O IIEF já foi validado em 32 línguas, tem sido recomendado para avaliação diagnóstica da gravidade de DE e pode ser utilizado por médicos e pesquisadores para avaliação da eficácia/efetividade de intervenções em ensaios clínicos e terapêuticos.^{12; 14} Este questionário foi desenvolvido em conjunto com o programa de ensaios clínicos para o sildenafil, e desde então tem sido adotado como a medida padrão-ouro para a avaliação da eficácia em ensaios clínicos de DE e usado como desfecho primário em mais de 50 ensaios clínicos.¹⁴

Segundo Capelleri et al., para pacientes com vida sexual ativa, a DE pode ser classificada em cinco categorias a partir do domínio função erétil (FE) do IIEF, cuja pontuação varia de 6 a 30, conforme mostra a tabela 1.¹⁵

Tabela 1 – Classificação do grau de DE segundo a pontuação no domínio função erétil do questionário IIEF

Categoria	Pontuação
Severa	6 a 10
Moderada	11 a 16
Leve para Moderada	17 a 21
Leve	22 a 25
Sem disfunção erétil	26 a 30

Adaptado de Gonzáles et al. (2013).

1.2 O óxido nítrico e a disfunção erétil

1.2.1 Fisiologia da função erétil

O pênis compreende os corpos cavernosos que são tecidos eréteis e um corpo esponjoso que suporta e delinea a uretra.⁶ A ereção peniana é modulada por

hormônios e alguns fatores psicológicos e ocorre em resposta a estímulos eróticos, que podem ser estímulos visuais, olfativos, auditivos ou táteis.⁷

Durante uma ereção peniana normal ocorrem alguns processos simultâneos e sinérgicos, tais como: agentes vasodilatadores liberados nas terminações nervosas cavernosas que causam uma vasodilatação das arteríolas aferentes do pênis aumentando o fluxo sanguíneo; as células musculares lisas dos corpos cavernosos se relaxam; células endoteliais do corpo cavernoso liberam vasodilatadores capazes de manter esse fluxo; e o fluxo sanguíneo venoso peniano é obstruído, o que aumenta a pressão intra-cavernosa e leva ao intumescimento do pênis.⁶

O óxido nítrico (NO) é gerado a partir de L-arginina pela NO sintase (NOS), que possui três isoformas: endotelial, neuronal e induzível (eNOS, nNOS e iNOS, respectivamente)¹⁰. Existem diversos mecanismos capazes de ativar o relaxamento da vasculatura cavernosa, sendo o NO liberado pelas terminações nervosas não adrenérgicas/não colinérgicas (NANC) e pelas células endoteliais o principal mediador químico responsável pelo relaxamento do músculo liso vascular e do corpo cavernoso do pênis.⁶

Após um estímulo sexual (figura 1), as fibras NANC que inervam o pênis liberam NO, produzido pela enzima nNOS, que ao entrar na célula muscular lisa é capaz de ativar a guanilato ciclase solúvel e, conseqüentemente, aumentar os níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc).^{16; 17} Uma proteína quinase dependente de GMPc, a proteína quinase G, altera os níveis de íons cálcio intracelular ao reduzir a atividade dos canais de cálcio ou ao fosforilar outras proteínas, as quais também afetam os canais de cálcio e alteram o estado de fosforilação da subunidade regulatória da cadeia leve de miosina, levando ao relaxamento do músculo liso cavernoso e à vaso dilatação das arteríolas aferentes. O aumento do fluxo

sanguíneo causa stress de cisalhamento no endotélio do corpo cavernoso, induzindo a produção de NO pela enzima eNOS. Isto leva ao início da ereção.

Figura 1 – Fisiologia da ereção peniana

Esquema resumindo a fisiologia da ereção peniana. Frente a um estímulo sexual, as fibras nervosas NANC liberam NO através da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), o qual age nas células musculares lisas aumentando a produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que, através de uma cascata de eventos, leva ao relaxamento do músculo liso vascular das arteríolas aferentes do pênis. O aumento do fluxo sanguíneo causa stress de cisalhamento no endotélio do corpo cavernoso, induzindo a produção de NO pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Isto leva ao início da ereção. A manutenção da ereção se dá pela obstrução dos vasos venosos eferentes, aprisionando o sangue dentro do pênis, que fica ereto. Além disso, a produção de óxido nítrico é sustentada através da fosforilação de ambas enzimas em resíduos de serina (posição indicada abaixo das enzimas na figura), mantendo-as ativadas mesmo na ausência de novos estímulos. A enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5) degrada o GMPc. A ação da PDE-5 e, principalmente, a liberação de noradrenalina (NA) e angiotensina II (Ang II) no corpo cavernoso levam ao fim a ereção. MLC-P, subunidade regulatória da cadeia leve de miosina fosforilada; 5'GMP, guanosina 5'-monofosfato.

A manutenção da ereção se dá pela obstrução dos vasos venosos eferentes, aprisionando o sangue dentro do pênis, que fica ereto.^{6; 18} Além disso, a produção de óxido nítrico é sustentada através da fosforilação de ambas NO sintases, a nNOS na

serina da posição 1412¹⁹ e a eNOS na serina da posição 1177²⁰, mantendo-as ativadas mesmo na ausência de novos estímulos. A enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5) é responsável pela degradação do GMPc, diminuindo o acúmulo intracelular deste último, cancelando os efeitos causados pelo NO. A ação da PDE-5 e, principalmente, a liberação de noradrenalina (NA) pelas fibras adrenérgicas junto com o aumento da concentração de angiotensina II (Ang II) no corpo cavernoso levam ao processo de detumescência do pênis, dando fim a ereção.^{7; 18}

1.2.2 Fisiopatologia da DE

A função sexual normal envolve a coordenação de sistemas psicológicos, endócrinos, vasculares e neurológicos, e pode ser descrita como um processo biopsicossocial.³

Fatores psicológicos estão envolvidos em um número significativo de casos de DE, seja esta apenas psicogênica ou mista. O medo de falha durante a relação sexual ou ansiedade de desempenho é uma condição psicogênica importante relacionada à DE. Em teorias históricas, foram descritos múltiplos aspectos de desenvolvimento, cognitivos, afetivos e interpessoais como fatores psicológicos que predisponham os homens à DE.³ Atualmente, acredita-se que a DE psicogênica está relacionada principalmente com três grupos de fatores, sendo estes:

- predisponentes: experiências passadas traumáticas, educação rígida, educação sexual inadequada e problemas de saúde física e mental;
- precipitantes: problemas de relacionamento agudos, pressões familiares ou sociais e eventos importantes da vida, como gravidez, parto ou perda de emprego; e

- manutenção: problemas de relacionamento, problemas de saúde física ou mental, não conhecimento da disponibilidade de diversas opções de tratamento.³

Certas doenças neurológicas estão frequentemente associadas à DE, incluindo esclerose múltipla, epilepsia do lobo temporal, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer e lesão da medula espinal. Pacientes submetidos a cirurgias pélvicas radicais (por exemplo, prostatectomia radical) têm um risco especialmente elevado de lesão de estruturas neurovasculares que inervam o pênis e subsequente DE neurogênica. No entanto, os recentes avanços nas técnicas cirúrgicas reduziram significativamente a incidência de DE pós-cirurgia pélvica.³

A DE vasculogênica é causada pela inabilidade do relaxamento do músculo liso vascular da túnica média das artérias, arteríolas e sinusóides cavernosos, sendo caracterizada por um desequilíbrio entre fatores contráteis e relaxantes, no qual prevalecem efeitos contráteis que mantêm o pênis em seu estado flácido.⁶

Para que ocorra a ereção peniana é necessário que haja uma integridade das terminações nervosas e do tecido cavernoso, já que a ereção é um fenômeno neurovascular.⁷ Além disso, outro fator que contribui de maneira importante com a dificuldade de ereção é a disfunção endotelial da vasculatura peniana.⁶ Diversos fatores podem levar ao desenvolvimento de DE, como hipertensão, diabetes, hábito de fumar, idade, alcoolismo e outros, pois podem alterar a estrutura do tecido cavernoso e/ou os mecanismos inter e intracelulares que regulam o processo de contração e de relaxamento das células musculares lisas do corpo cavernoso.^{6; 21; 22}

O NO proveniente da eNOS tem um papel muito importante na manutenção da ereção após o estímulo inicial pelas fibras NANC.⁶ A incapacidade do endotélio

de produzir relaxamento da musculatura lisa adjacente via NO é denominada disfunção endotelial. Esse parece ser o fator em comum entre diversas doenças cardiovasculares e a DE.⁶ De fato, existem diversas evidências mostrando que uma redução na produção de NO pelo endotélio pode levar à DE.²³

Doenças podem alterar o relaxamento do músculo liso cavernoso dependente da atividade da eNOS através de alterações na expressão do gene NOS3, aumento de stress oxidativo (levando ao desacoplamento da eNOS e/ou sequestrando o NO), alteração nos mecanismos de fosforilação da eNOS, redução da disponibilidade de L-arginina ou o cofator tetrahidrobiopterina (BH₄), competição da L-arginina com o antagonista endógeno dimetilarginina assimétrica (ADMA) pelas NO sintases, aumento na expressão de fosfodiesterases, remodelamento tecidual, e produção de antagonistas fisiológicos que se contrapõem à ação do NO (por exemplo, Ang II e produtos das ciclooxigenases).²³

Além dos fatores bioquímicos alterados nas doenças, acredita-se que polimorfismos em genes relacionados à via de produção do NO poderiam alterar o risco para a DE. De fato, foi demonstrado que níveis plasmáticos das arginases 1 e 2 e polimorfismos nos genes codificantes destas proteínas podem servir como biomarcadores de risco para a DE, já que essas enzimas podem reduzir localmente a disponibilidade do substrato da NOS.²⁴

1.3 A dimetilarginina assimétrica

A ADMA é uma forma natural de L-arginina (figura 2) que deriva da proteólise de proteínas metiladas e age como um inibidor endógeno dos três subtipos de NOS (eNOS, nNOS e iNOS).^{25; 26} Dessa forma, quando estão presentes concentrações maiores de ADMA ocorre uma redução na produção de NO por essas enzimas. De

fato, a ADMA foi implicada na patogênese de doenças cardiovasculares pela redução da síntese de NO.²⁷

Figura 2 – Arginina e suas formas

L-NMMA, monometilarginina; ADMA, dimetilarginina assimétrica; SDMA, dimetilarginina simétrica. Fonte: Masuda (2008).

Além disso, há um claro aumento dos níveis plasmáticos de ADMA em pacientes com diversas doenças cardiovasculares.^{28; 29; 30; 31} Diversos estudos mostram que os níveis plasmáticos de ADMA podem prever eventos deletérios e mortalidade cardiovascular.²⁵ A ADMA surge a partir da proteólise de proteínas que sofreram uma modificação pós-traducional através da metilação de resíduos de arginina por enzimas chamadas proteína-arginina metiltransferases (*protein arginine methyltransferases*, PRMTs) do tipo I.^{25; 32} Centenas de proteínas diferentes são alvos para as PRMTs e existem pelo menos 5 diferentes PRMTs do tipo I capazes de gerar estas metilações que dão origem à ADMA (PRMT1, PRMT2, PRMT3,

PRMT4 e PRMT6),³² sendo que a PRMT1 contribui com a principal atividade enzimática dessa classe de enzimas presente em células e tecidos de mamíferos.³³ Há, portanto, uma clara complexidade no processo de formação da ADMA. Por outro lado, a ADMA é metabolizada através das enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1 e 2 (DDAH1 e DDAH2) e da alanina–glioxilato aminotransferase 2 (AGXT2),²⁵ sendo as duas primeiras as principais responsáveis pelo metabolismo da ADMA.³⁴

1.3.1 As enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1 e 2

A ADMA é metabolizada em citrulina e dimetilamina pela ação das enzimas DDAH1 e DDAH2,^{34; 35} e suas concentrações plasmáticas (aproximadamente 0,5 μM em indivíduos saudáveis) são mantidas pela degradação enzimática (80%) e pela excreção renal (20%).^{36; 37}

As duas isoformas de dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH) têm ampla distribuição nos tecidos, mas diferem quanto às suas localizações. A DDAH1 é expressa principalmente no fígado e rins (principais locais para o metabolismo da ADMA),^{38; 39} pâncreas, cérebro anterior, células endoteliais, células do músculo liso vascular, adipócitos e em tecidos que expressam a nNOS.^{40; 41; 42; 43} A DDAH2 é encontrada principalmente no endotélio vascular, que expressa eNOS, nos tecidos imunes (baço, timo, leucócitos periféricos, nódulo linfático e medula óssea), que expressam iNOS, no coração, medula espinhal, placenta, tecidos fetais e rins.^{41; 42; 43} Além disso, estudos demonstraram a expressão das DDAHs no corpo cavernoso de ratos.^{44; 45; 46}

A DDAH2 pode aumentar a geração de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), através de interação proteína-proteína, tendo assim papel na promoção da angiogênese.⁴⁷ Estudos de silenciamento ou supressão de genes em roedores mostraram que os níveis plasmáticos de ADMA são regulados pela DDAH1, ao passo que a DDAH2 é bastante importante para a preservação da função endotelial nos vasos de resistência e parece ser necessária para a vasodilatação dependente de acetilcolina.^{42; 48; 49; 50} Desta forma, uma forma de melhorar a saúde vascular seria a ação terapêutica com alvo na atividade e expressão dessas duas enzimas.^{51; 52}

A expressão do gene *DDAH1* é regulada positivamente por fatores como: interleucina-1 beta (IL-1 β), *cytochrome b-245 alpha chain* (p22phox) e nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase (NADPHox); e negativamente por: Ang II, lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Quanto ao gene *DDAH2*, sua expressão é regulada positivamente por: ácido transretinóico, estradiol, pioglitazona, p22phox, NADPHox e Ang II; e negativamente por: lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), fator de acoplamento 6, glicose alta, e baixa pressão de oxigênio (pO₂).^{42; 53} Ainda, a atividade da DDAH é influenciada pela disponibilidade de L-arginina,⁵⁴ por citocinas inflamatórias⁵⁵ e por S-nitrosilação pelo NO.⁵⁶ Além disso, espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pela NADPHox ou por homocisteína exercem ampla inibição pós-transcricional desta enzima.^{42; 57; 58}

1.3.2 As enzimas DDAH1 e DDAH2 e a disfunção erétil

É sabido que níveis elevados de inibidores endógenos da NOS, como a ADMA e a monometilarginina L-NMMA, podem ser um fator importante na

diminuição da produção de NO.^{44; 59; 60} Elevados níveis de ADMA foram encontrados em várias desordens associadas à disfunção da NOS, tais como hipercolesterolemia,⁶¹ insuficiência renal,⁶⁰ hipertensão,⁶² hiperglicemia,⁶³ aterosclerose,⁶⁴ hipertensão pulmonar,⁶⁵ insuficiência cardíaca congestiva,⁶⁶ doença renal associada com doença cardiovascular,^{60; 67} diabetes tipo 1 não complicada,⁶⁸ pré-eclampsia,⁶⁹ e DE arteriogênica.⁷⁰

As diversas vias de síntese de ADMA são complexas, mas desembocam em um pequeno número de proteínas que controlam a eliminação do ADMA. Como já citado anteriormente, a ADMA e a L-NMMA são metabolizadas pelas duas isoformas da enzima DDAH.^{35; 43} Sendo assim, é possível que fatores que alterem a atividade e/ou expressão destas enzimas estejam associados à DE.

Essa hipótese é plausível, visto que o NO tem sido demonstrado como principal mediador do relaxamento do músculo liso cavernoso e da ereção peniana.^{71; 72; 73; 74} Em estudos com coelhos, evidenciou-se que o extrato da fumaça de cigarro reduziu a expressão de DDAH1 no tecido cavernoso desses animais, aumentou a ADMA e prejudicou a função erétil, em paralelo a outras alterações na via,⁴⁴ e, em modelo de isquemia, observou-se produção diminuída de NO e aumento dos conteúdos de L-NMMA e ADMA no corpo cavernoso.⁴⁵ Em um modelo de rato com aterosclerose, foi demonstrado que a diminuição da atividade de DDAH é a causa do acúmulo de ADMA no corpo cavernoso, levando a uma redução da atividade da NOS e ao comprometimento da função erétil.⁴⁶ Esse mesmo fenômeno de inibição das DDAHs com aumento de ADMA e redução da produção de NO também foi observado em outros contextos.^{75; 76; 77}

Foi demonstrado que níveis aumentados de ADMA estão presentes em pacientes com DE, especialmente nos casos de etiologia vascular.⁷⁰ Além disso, as

concentrações plasmáticas de ADMA nesses pacientes se correlacionaram inversamente aos scores de função erétil determinados pelo IIEF.⁷⁰ Também em pacientes com DE, as concentrações circulantes de ADMA foram correlacionadas com fatores de risco cardiovascular.⁷⁸ Ainda, pacientes com doença arterial coronariana crônica tiveram as concentrações de ADMA plasmática associadas com DE em diversos estudos.^{78; 79}

Os efeitos negativos de infusão de ADMA e a recuperação de danos vasculares são melhorados pela superexpressão de DDAH1 ou DDAH2.^{80; 81; 82; 83; 84} Esse achado é consistente com o fato que as deleções heterozigota e homozigota do gene *DDAH1* de ratos elevaram significativamente as concentrações de ADMA no plasma e estão associadas à redução da produção cardiovascular de NO e aumento da pressão arterial.^{48; 85}

Diversos estudos já foram realizados, em modelos animais e humanos, demonstrando alterações na expressão e/ou atividade das enzimas DDAHs em doenças nas quais a sinalização comprometida de NO tem sido implicada na fisiopatologia.^{86; 87; 88}

Apesar de já ter sido demonstrado que concentrações reduzidas de nitrito plasmático se relacionaram com melhores respostas ao sildenafil no tratamento da DE,⁸⁹ até hoje ninguém verificou se fatores que alterem a atividade e/ou expressão das enzimas DDAHs estão associados a eficácia desse tratamento, podendo tornarem-se ferramentas úteis para prever as respostas de pacientes.

1.3.3 Relevância de polimorfismos genéticos nos genes *DDAH1* e *DDAH2*

Mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) podem levar a variação genética em todo o genoma humano. Essas variantes podem persistir ao longo de gerações, caso não resultem em alterações graves. Se a frequência de uma variante atinge mais de 1% em uma população, ela é chamada de polimorfismo. Variantes genéticas podem manifestar-se de diversas maneiras, sendo os polimorfismos mais estudados as inserções/deleções, variantes de número de cópias e os polimorfismos de base única ou *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Os SNPs têm, geralmente, apenas duas formas alternativas denominadas alelos em um locus específico de um gene. A frequência do alelo menos frequente de um SNP em uma população é denominada *minor allele frequency* (MAF).⁹⁰

Diferentes polimorfismos em um mesmo cromossomo podem ser herdados em conjuntos, os quais são chamados de haplótipos, sendo que cada haplótipo combina diferentes alelos destes diferentes polimorfismos. A passagem do material genético dos pais para os filhos não engloba apenas a combinação de haplótipos paternos e maternos, mas inclui também o processo de recombinação, onde um cromossomo (haplótipo, alelo) de um genitor troca parte de seu material genético com o outro cromossomo do mesmo genitor, portanto havendo uma transmissão dos haplótipos de pais para filhos de forma não óbvia. Existem regiões no cromossomo onde o processo de recombinação acontece de forma mais favorável e, consequentemente, com maior frequência. Existem outras regiões onde na realidade a recombinação acontece muito raramente, formando um bloco onde há clara passagem de toda uma combinação de alelos de polimorfismos próximos dos pais para os filhos. A isso se denomina bloco haplotípico. O estudo da hereditariedade

dos traços podem estudar uma propriedade do DNA relacionada justamente a se os alelos de um polimorfismo segregam em conjunto com outros alelos dos polimorfismos vizinhos, ou se a segregação acontece de forma aleatória. Essa propriedade se chama ligação, e se diz que alelos que segregam em conjunto estão ligados. É possível mensurar o grau de ligação entre diferentes *loci* através do “desequilíbrio de ligação” (*Linkage Disequilibrium*, LD), e esta propriedade tem sido utilizada na tentativa de identificar variantes causadoras de doenças ou de fenótipos de interesse. Podemos pensar no LD como uma combinação entre diferentes *loci*: conhecendo o genótipo de um SNP pode-se prever o genótipo de outro SNP se a associação (LD) for alta entre estes dois polimorfismos.⁹¹

A enzima DDAH1 é codificada pelo gene *DDAH1*, localizado no braço curto do cromossomo 1 (região 1p22); já DDAH2 é codificada pelo gene *DDAH2* (figura 3), localizado no braço curto do cromossomo 6 (região 6p21.3).⁹²

Figura 3 – Mapa do gene *DDAH2*

Representação esquemática exemplificando a estrutura do gene *DDAH2*, sendo os introns representados pelas linhas e os exons pelas caixas. As setas indicam a posição dos polimorfismos selecionados para este estudo. Adaptado de Jones et al. (2003).

Estudos clínicos recentes têm mostrado que polimorfismos nos genes *DDAH1* e *DDAH2* são capazes de modular os níveis plasmáticos de ADMA,^{93; 94; 95} e que esses níveis quando aumentados, também aumentam o risco para desfechos cardiovasculares.^{96; 97; 98} A associação direta entre polimorfismos no *DDAH1* e

desfechos cardiovasculares já foi demonstrada em chineses com respeito a infarto e doença coronariana,⁹⁹ porém necessita de ampliação e validação em outras populações.

Foram selecionados para este estudo polimorfismos no gene *DDAH1* e no gene *DDAH2* que, apesar de não possuírem ensaios moleculares que demonstrem de forma inequívoca evidência funcional, estão associados a alterações nas concentrações circulantes do produto (ADMA) degradado pelas enzimas codificadas por esses genes. Sendo assim, estes polimorfismos podem ser bons candidatos para avaliação em pacientes com DE. Todos os polimorfismos selecionados tem uma frequência relativamente alta (acima de 27%, tabela 2), o que nos permite fazer análises de associação sem necessitar de um grande número de pacientes.

Tabela 2 – Evidências clínicas e funcionais dos polimorfismos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* selecionados para o estudo

SNP	Alelos (MAF)	Localização no gene	Fenótipos associados
<i>DDAH1</i>			
rs1554597	T/C (C=0.41)	Intron 1	<ul style="list-style-type: none"> Portadores do alelo C têm maiores concentrações circulantes de ADMA.^{94; 100}
rs18582	G/A (G=0.40)	Intron 1	<ul style="list-style-type: none"> Genótipo GG associado a maior concentração plasmática de ADMA;^{100; 101} está em LD ($r^2 < 0,88$) com os outros polimorfismos associados à ADMA.¹⁰⁰
<i>DDAH2</i>			
rs805304	C/A (C=0.27)	Região promotora	<ul style="list-style-type: none"> Polimorfismo associado com hipertensão,¹⁰² e risco cardiovascular;^{103; 104} portadores do alelo C têm maior concentração circulante de ADMA.¹⁰⁵
rs805305	C/G (C=0.32)	Intron 2	<ul style="list-style-type: none"> SNP associado a doença cardiovascular,¹⁰³ hemorragia cerebral¹⁰⁶ e hipertensão;¹⁰² alelo G associado a alterações da concentração plasmática de ADMA.^{107; 108; 109}

SNP, *single nucleotide polymorphism*; MAF, *minor allele frequency* – dados obtidos a partir da plataforma dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) usando a população CEU (caucasianos).

1.4 Tratamento da disfunção erétil com sildenafil

O sildenafil é um inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (iPDE-5), assim como o tadalafil, o vardenafil, o lodenafil e outros; e sua eficácia e segurança no tratamento de DE pode ser explicada por sua maior seletividade à PDE-5 em relação aos outros tipos de PDE, já que a PDE-5 é a mais presente no corpo cavernoso.¹¹⁰ Sabe-se que o relaxamento do músculo liso é dependente de GMPc, desta forma, o uso de sildenafil, que inibe a PDE-5, aumenta a quantidade de GMPc intracelular, amplificando a sinalização responsável pelo relaxamento do músculo liso.¹¹¹

Quanto à farmacocinética, o sildenafil tem biodisponibilidade de 40% e atinge sua concentração plasmática máxima em 1 hora. Após a absorção, o sildenafil é convertido em um metabolito ativo N-desmetil, que representa 20% da sua atividade farmacológica. A meia-vida do sildenafil e do metabolito N-desmetil é de 4 horas.¹¹² Este fármaco é metabolizado pelas vias CYP3A4 e CYP2C9 e tem taxas de depuração reduzidas em voluntários com mais de 65 anos. Ainda, pacientes com cirrose hepática revelaram concentrações máximas elevadas. Sendo assim, a dose inicial para pacientes com idade acima de 65 anos ou que tenham cirrose grave é de 25 mg 1 hora antes da atividade sexual.¹¹² Quando tomado com uma refeição gordurosa, o sildenafil tem uma redução na concentração sérica máxima (Cmax) de 29%, com um atraso de até 1 hora no tempo necessário para atingir a concentração sérica máxima (Tmax). Estes efeitos podem ser superados instruindo os doentes a atrasar a administração de sildenafil 1 a 2 horas após comer, ou a tomar com uma refeição menos gordurosa.¹¹³

No tratamento da DE, o uso de fármacos da classe dos iPDE-5, por via oral, é o que tem apresentado maior sucesso entre as abordagens terapêuticas

existentes.¹¹⁴ Por isso, tais medicamentos são considerados terapia farmacológica de primeira linha.¹¹⁵

Na prática clínica, o sildenafil é um dos fármacos mais utilizados, mas a resposta ao tratamento nem sempre é igual entre os pacientes, sendo alguns destes não responsivos. A resposta inicial aos iPDE-5 é de 60 a 70% na população com DE em geral, mas 30 a 40% de respondedores iniciais não estão satisfeitos com o tratamento sob demanda, mesmo após a restauração da função erétil.¹¹⁵ Na população de pacientes com DE e DM a porcentagem de pacientes não responsivos ao sildenafil chega a 50%.¹¹⁶ Em um estudo com pacientes que passaram por prostatectomia radical, as taxas de satisfação da terapia com sildenafil no pós-operatório precoce foram baixas (26% de 0 a 6 meses após a prostatectomia com preservação de nervos), mas estas taxas aumentaram para 60% de satisfação após 18 a 24 meses da realização da cirurgia.¹¹⁷

Fatores associados à falta de resposta aos iPDE-5 são: severidade da DE; outras medicações; uso incorreto do fármaco; e comorbidades como DM, doença vascular, radioterapia para câncer de próstata, hipogonadismo, fatores psicossociais e danos neurológicos.¹¹⁵ Embora já tenha sido descrito que esses fatores piorem a resposta ao sildenafil em pacientes com DE, ainda existem muitos fatores a serem estudados e que podem estar relacionados às diferenças nas respostas ao tratamento com esse fármaco.

1.4.1 Marcadores genéticos e bioquímicos podem alterar a resposta ao tratamento com sildenafil

Devido à relevância crítica da via do NO-GMPc para a DE e sua terapia, a maioria dos estudos farmacogenéticos em DE têm-se centrado nessa via.¹⁸

Em estudos recentes, foi evidenciado que o tratamento da DE com sildenafil pode ser afetado por polimorfismos nos genes *NOS3*¹¹⁸ e *NOS1*¹¹⁹ e em outros genes relacionados com a produção do NO.¹²⁰ Ainda, outro estudo mostrou que concentrações plasmáticas alteradas de nitrito (marcador bioquímico da produção endógena de NO) também são capazes de modificar a resposta ao sildenafil em pacientes com DE.⁸⁹ Nos estudos citados acima, os pacientes foram divididos de acordo com a etiologia da doença em grupos com DE decorrente da cirurgia de prostatectomia (DE predominantemente neurogênica), e com DE clínica (DE predominantemente vasculogênica). Foi observado que os pacientes com DE clínica apresentaram piores respostas ao sildenafil quando portavam alelos associados a uma maior produção de NO ou se possuísssem maiores concentrações plasmáticas de nitrito. No entanto, os pacientes com DE pós-prostatectomia portadores de alelos relacionados a uma maior produção de NO apresentaram melhores respostas ao sildenafil.

Ainda não há na literatura nenhum estudo que investigue as bases genéticas relacionadas ao metabolismo do ADMA e o grau de resposta ao sildenafil. Dada a enorme relevância do ADMA sobre a função erétil e seu envolvimento no estabelecimento da DE, é provável que SNPs que alterem a atividade das DDAHs possam ter um impacto real sobre o sucesso da terapia em pacientes com DE, sendo este o objeto de estudo do presente trabalho.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

O NO é o principal fator de relaxamento do músculo liso envolvido na ereção peniana, através do aumento das concentrações de GMPc. O sildenafil é um fármaco que inibe a degradação de GMPc intracelular, facilitando o início e a manutenção da ereção. A ADMA é uma molécula inibidora da síntese de NO, e é capaz de gerar DE em animais. As enzimas DDAH 1 e 2 são responsáveis pelo metabolismo de ADMA. Polimorfismos genéticos podem alterar a expressão ou a funcionalidade das enzimas DDAH1 e DDAH2, e consequentemente alterar a produção de NO. Estudos anteriores relacionaram uma maior produção de NO com piores respostas ao sildenafil em pacientes com DE clínica e com melhores respostas a este mesmo fármaco em pacientes com DE pós-prostatectomia.

Desta forma, a hipótese do presente estudo é que polimorfismos genéticos dos genes *DDAH1* (rs1554597 e rs18582) e *DDAH2* (rs805304 e rs805305) estão associados com a magnitude da resposta ao tratamento com sildenafil, supondo-se que portadores dos alelos relacionados a menores concentrações plasmáticas de ADMA (i.e., T do rs1554597, A do rs18582, A do rs805304 e G do rs805305) apresentem piores respostas no grupo com DE clínica e melhores respostas no grupo com DE pós-prostatectomia.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as bases genéticas que podem predizer se um paciente terá benefício clínico ou não no tratamento com sildenafil para a DE.

3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar se polimorfismos dos genes *DDAH1* (rs1554597 e rs18582) e *DDAH2* (rs805304 e rs805305) estão associados com a resposta ao sildenafil;
- b) Verificar se haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* (que incluem os polimorfismos acima mencionados) estão associados com a resposta ao sildenafil.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos participantes

Foram selecionados 140 pacientes, sendo 70 com DE pós-prostatectomia (DEPP) e 70 com DE clínica (DEC), do Ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), sob a coordenação do Prof. Dr. Sílvio Tucci Junior da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EERP-USP) (número do processo: 51398915.1.0000.5393).

Os critérios de inclusão dos pacientes no estudo foram: idade entre 18 e 80 anos; queixas envolvendo a atividade sexual; diagnóstico médico de DE; ter prescrição médica para o uso de sildenafil; e resultado do questionário IIEF com pontuação < 26 no domínio FE. Já os critérios de exclusão foram: presença de hipogonadismo; hipotireoidismos; bexiga neurogênica; ejaculação precoce; implantes penianos; acidentes cerebrovasculares; traumas no sistema nervoso central; e anormalidades anatômicas, como a doença de Peyronie. Os pacientes que não usaram as doses prescritas de sildenafil pelo menos oito vezes ou que foram submetidos à prostatectomia radical há menos de um ano do momento de inclusão no estudo também foram excluídos.

Os pacientes seguiram o esquema diagnóstico e terapêutico da rotina habitual de manejo clínico empregada no Ambulatório de Urologia do HCFMRP. Cada voluntário assinou um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Após a assinatura do TCLE, o paciente permaneceu em repouso por cerca de 20 minutos e, então, sua pressão arterial foi aferida três vezes, obtendo-se um valor médio das três aferições para as pressões arteriais sistólica e diastólica. Em seguida, foi aplicado o questionário traduzido do IIEF¹² e coletado sangue por punção venosa em tubos a vácuo de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), gel e heparina de sódio, utilizando procedimentos adequados, para obtenção de sangue total, soro e plasma, respectivamente. As amostras foram armazenadas em freezers - 20 °C (sangue total) e - 80 °C (soro e plasma). Os pacientes fizeram uso domiciliar e sob demanda (por pelo menos oito vezes), de uma dose de sildenafil de 50 ou 100 mg, durante um período de 30 dias. Após esse período, no retorno habitual do paciente ao HCFMRP, foi feita nova avaliação com o questionário IIEF. Nenhuma prescrição médica ou qualquer outro procedimento foram alterados devido ao estudo, que é estritamente observacional.

4.2 Avaliação da função erétil e da resposta ao tratamento com sildenafil

A função erétil dos pacientes foi avaliada pelos scores do domínio FE do questionário IIEF antes e após o tratamento com sildenafil. Para avaliação da resposta ao fármaco, sendo o valor máximo de pontuação no domínio FE do IIEF (score IIEF) igual a 30, foram feitos os seguintes cálculos para cada paciente:

- a) $\text{score IIEF pós-tratamento} - \text{score IIEF pré-tratamento} = \Delta\text{IIEF}$;
- b) $30 - \text{score IIEF pré-tratamento} = \text{MRP}$; e
- c) $(\Delta\text{IIEF} / \text{MRP}) \cdot 100 = \Delta\text{IIEF}\%$.

Onde, MRP = máxima resposta possível e $\Delta\text{IIEF}\%$ = percentagem da MRP atingida pelo paciente.

Os valores de Δ IIEF e de Δ IIEF% e *score* IIEF pós-tratamento foram utilizados para medir as respostas dos pacientes ao sildenafil. Ainda, para avaliar a qualidade das respostas, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a mediana dos valores de Δ IIEF%: um grupo com valores acima da mediana, os bons respondedores (BR); e um grupo com valores abaixo da mediana, os maus respondedores (MR). Essa divisão foi feita de maneira independente nos grupos DEPP e DEC. A figura 4 resume as formas utilizadas para avaliar as respostas dos pacientes ao tratamento da DE com sildenafil.

Figura 4 – Avaliação da resposta ao sildenafil

A) Formas utilizadas para avaliar a resposta ao sildenafil: *score* IIEF pós-tratamento, reflete se o paciente teve ou não sucesso com a terapia; Δ IIEF, medida direta da resposta ao fármaco; Δ IIEF%, correção da resposta de cada paciente pelo seu grau de DE; resposta categórica, divisão dos pacientes de acordo com o tipo de resposta. **B)** Estratégia de divisão dos pacientes de cada grupo em bons e maus respondedores ao fármaco (acima e abaixo da mediana dos valores de Δ IIEF%, respectivamente). IIEF, Índice Internacional de Função Erétil.

4.3 Análises laboratoriais

A partir das amostras de sangue dos pacientes, foram utilizados kits comercialmente disponíveis (Lab Test, Brasil) com técnicas padronizadas para

dosagem de lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol total, triglicérides, uréia, creatinina e níveis de glicemia de jejum. A concentração de lipoproteína de baixa densidade foi calculada de acordo com a fórmula Friedwald's.

4.4 Extração de DNA genômico

As extrações do DNA genômico dos pacientes foram feitas a partir de amostras de 500 µL de sangue total. Ao sangue foi acrescido 1,5 mL de solução A (Triton X 1%, $MgCl_2$ 5 mM, sacarose 0,32 M e Tris-HCl 10 mM pH 8), seguido por homogeneização e incubação em gelo por 15 minutos. Após as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram completados com solução A, homogeneizados e centrifugados novamente. Estes passos foram repetidos 4 vezes ou mais, até o sobrenadante ficar límpido e obterem-se pellets de cor branca (leucócitos) nos tubos. Os pellets foram ressuspensos em 100 µL de solução B 2X (Na_2EDTA 20 mM, NaCl 20 mM e Tris-HCl 20 mM) e adicionados de 50 µL de solução C (preparada no momento do uso - SDS 5%, 25 µL de solução B 2X, 12,5 µL de água milli-Q e 2,5 µL de solução de proteinase K 20 mg/mL). Os tubos foram deixados em repouso no banho-maria à 37°C overnight.

Após o repouso, foram adicionados aos tubos 50 µL de tris-ácido etileno diamino tetra acético (TE) e 300 µL de fenol, com posterior homogeneização por inversão durante 5 minutos, centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C, e coleta da fase superior (aquosa) de cada amostra, que foi transferida para novo tubo. Aos novos tubos foram adicionados 150 µL de fenol e 150 µL de solução clorofórmio / álcool isoamílico (24:1), seguindo os mesmos passos da etapa anterior

descrita acima. Seguiu-se com adição de 300 µL de solução clorofórmio / álcool isoamílico (24:1) e, novamente, os passos de homogeneização, centrifugação e transferência da fase aquosa das amostras para novos tubos. Após, observou-se o volume obtido de fase aquosa para cada amostra e adicionou-se 1/10 deste volume de acetato de sódio 3 M pH 5,4 e duas vezes o volume de etanol absoluto gelado (-20°C) em cada tubo, que foram armazenados em freezer a -20°C por 2 horas.

Na sequência, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos em 14.000g a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Adicionou-se 500 µL de etanol 70% gelado, com posterior agitação e centrifugação (15 minutos em 14.000g a 4°C) e descarte dos sobrenadantes. Os tubos contendo DNA foram deixados abertos e deitados de lado (na capela de exaustão com a janela fechada) por uma hora para evaporação do etanol e, depois, foram adicionados 100 µL de TE, homogeneizados e deixados em repouso no banho-maria à 37 °C overnight.

Posteriormente, as amostras de DNA genômico foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), diluídas (quando necessário) a 300 ng/µL e armazenadas em freezer a -20°C. Partindo das amostras concentradas, foram feitas soluções de DNA a 5 ng/µL para as análises, que foram armazenadas em geladeira.

4.5 Genotipagens

As genotipagens dos quatro SNPs foram realizadas utilizando técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), as quais foram padronizadas em nosso laboratório. Todos os *primers* utilizados nas PCRs de cada polimorfismo foram desenhados utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST da NCBI e o *software* Gene

Runner 5.0. Após o desenho, os primers foram sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich®. Partindo de uma PCR padrão, o primeiro passo para a padronização das PCRs foi determinar uma temperatura de anelamento ideal a ser utilizada na ciclagem da PCR de cada SNP. Com base na temperatura de *melting* (T_m) dos pares de primers (fornecida pelo fabricante) utilizados em cada PCR, estabeleceu-se um gradiente de temperatura de anelamento. Para cada polimorfismo, este gradiente foi testado em uma reação de PCR, variando-se em 1°C, entre as colunas do termociclador, a temperatura de anelamento utilizada na ciclagem. Através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com o corante fluorescente de ácidos nucleicos GelRed™ (Biotium Inc.), foram observadas as bandas dos produtos de amplificação nas diferentes temperaturas de anelamento. Após análise das bandas, selecionou-se, para a PCR de cada SNP, a temperatura de anelamento na qual a banda do produto de interesse (que contém o SNP) estava mais intensa e que continha nenhum ou poucos produtos de amplificação inespecíficos. Visando ainda a eliminação de produtos inespecíficos, foram ajustadas as concentrações dos primers, do cloreto de magnésio e/ou de DNA genômico utilizadas na PCR de cada polimorfismo, quando necessário.

Para as genotipagens dos rs1554597, rs805304 e rs805305 também foi utilizada a técnica de digestão enzimática (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP). Para padronizar o preparo das digestões, foi feita a quantificação do produto amplificado na PCR de cada SNP em amostras de dez pacientes, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). O valor médio da quantificação do produto de PCR das amostras foi de 383,8 ng/μL para o rs1554597, 285,7 ng/μL para o rs805304 e 400,2 ng/μL para o rs805305. Sabendo-se que uma unidade de enzima de restrição é capaz de digerir 1

µg de DNA, estes valores médios foram utilizados para calcular o volume da solução da PCR inserido na solução da digestão enzimática de cada polimorfismo. Posteriormente, a cada digestão enzimática foram utilizados controles positivos dos genótipos heterozigoto e homozigoto cujos produtos foram cortados pela enzima. Isto visou a detecção de possíveis digestões parciais que poderiam levar a falsos heterozigotos. Obtivemos 100% de consistência no perfil eletroforético dos controles positivos entre todas as bateladas de digestões, o que descarta a possibilidade de erros de genotipagem. Isto também foi confirmado por uma repetição de ao menos 10% das amostras (obtivemos 100% de consistência entre os resultados) e a ausência de desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Após a padronização, as PCRs dos quatro polimorfismos seguiram basicamente o mesmo programa de ciclagem, alterando-se apenas a temperatura de anelamento dos primers para cada reação: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos para desnaturação do DNA; 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, X°C por 30 segundos para anelamento dos primers e 72°C por 30 segundos para extensão do produto; e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos para garantir a extensão (sendo X = 61°C para o rs1554597; 66,9°C para o rs18582; 65,5°C para o rs805304; e 60°C para o rs805305). Os produtos de amplificação das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com GelRed™, aplicando-se 3 µL da solução da PCR por poço. As condições da eletroforese foram tempo de 1 hora e 30 minutos a 150 W, 300 V e 100 mA. Os fragmentos de DNA obtidos nas digestões enzimáticas foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% também preparado com GelRed™, aplicando-se 10 µL do produto digerido por poço. As condições da eletroforese foram tempo de 1 hora e 30 minutos a 150 W, 300 V e 150 mA. A

seguir, descrevem-se as particularidades das técnicas utilizadas nas genotipagens de cada SNP.

4.5.1 rs1554597 do gene *DDAH1* (T/C)

A genotipagem deste SNP foi realizada por PCR seguida de digestão enzimática. Os *primers* utilizados na PCR foram desenhados como segue:

- *Primer forward*: 5'-ACAGTTGACAGTGAGGCAGG-3'; e
- *Primer reverse*: 5'- AGACAGAAGGACAGCACAGC-3'.

Foi preparada uma solução para a PCR com volume final de 15 µL por amostra, contendo: tampão 1X; cloreto de magnésio 1,5 mM; *deoxynucleotide solution mix* (dNTP) 0,2 mM; *primers forward* e *reverse* 0,1 µM cada; 0,5 U de enzima Taq polimerase; e 40 ng de DNA genômico. O produto de interesse amplificado nesta reação é de 300 pares de base (pb) (figura 5A).

Para a digestão enzimática foi preparada uma solução com volume final de 10 µL por amostra, contendo: tampão 1X; 1 U da enzima de restrição Hpy188III (BioLabs Inc.); e 1 µg do produto da PCR. As digestões foram feitas com incubação a 37 °C por uma hora e meia, com posterior aquecimento a 65°C por 20 minutos para inativação da enzima. A enzima Hpy188III cliva o produto da PCR que contém o alelo C em dois fragmentos de 210 pb e 90 pb. O produto da PCR contendo o alelo T não é clivado pela enzima, mantendo seu tamanho de 300 pb (figura 5B).

Figura 5 – Genotipagem do rs1554597

A) Produtos da PCR com tamanho de 300 pb. **B)** Digestão enzimática dos produtos da PCR – a banda de 300 pb indica presença do alelo T e a banda de 210 pb indica a presença do alelo C – em branco são destacados os genótipos de controles positivos e em amarelo de amostras de pacientes. B, branco da PCR; L, *ladder* (padrão de peso molecular); pb, pares de base; TT, genótipo homozigoto ancestral; TC, genótipo heterozigoto; CC, genótipo homozigoto variante.

4.5.2 rs18582 do gene *DDAH1* (G/A)

A genotipagem deste SNP foi realizada pela técnica de PRC alelo específica.

Os *primers* utilizados na PCR foram desenhados como segue:

- *Primer forward* específico A: 5'-CGGAGGTGACTACAAAGCAA-3';

- *Primer forward* específico G: 5'-CGGAGGTGACTACAAAGCAG-3';
- *Primer forward* controle: 5'-GCAGTCAGAACTGGACGGTCA-3'; e
- *Primer reverse*: 5'- TGAGATGGGCACAACCTTGG-3'.

Foram preparadas duas soluções para PCR, uma para a PCR específica do alelo A e outra para a PCR específica do alelo G, ambas com volume final de 15 µL por amostra, contendo: tampão 1X; cloreto de magnésio 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; *primer forward* específico A ou G 0,3 µM; *primer reverse* 0,3 µM; *primer forward* controle 0,047 µM; 0,5 U de enzima Taq polimerase; e 20 ng de DNA genômico. As reações de PCR para os alelos A e G de cada paciente ocorreram concomitantemente no termociclador. Nesta PCR alelo específica são amplificados dois produtos de interesse (Figura 6). O primeiro produto tem 677 pb, é delimitado pelo *primer reverse* e pelo *primer forward* controle e ocorre nas duas PCRs específicas (A e G), servindo como controle positivo. O segundo produto tem 135 pb e é delimitado pelo *primer reverse* e por um *primer forward* específico (A ou G). A amplificação da reação determina a presença ou ausência do alelo. Para pacientes com genótipo GA, amplificam as duas bandas de 135; para pacientes com genótipo GG ocorre amplificação apenas na reação específica do alelo G; para pacientes com genótipo AA ocorre amplificação apenas na reação específica do alelo A.

Figura 6 – Genotipagem do rs18582

Produtos da PCR alelo específica – a banda de 677 pb indica o funcionamento da PCR (controle interno) e a banda de 135 pb indica a presença do produto alelo específico – na figura, as letras em azul claro apresentam a ordem de aplicação da PCR específica de cada alelo, colchetes em branco destacam os genótipos de controles positivos e em amarelo de amostras de pacientes. B, branco da PCR; L, *ladder* (padrão de peso molecular); pb, pares de base; GG, genótipo homozigoto ancestral; AG, genótipo heterozigoto; AA, genótipo homozigoto variante.

4.5.3 rs805304 do gene *DDAH2* (C/A)

A genotipagem deste SNP foi realizada por PCR seguida de digestão enzimática. Os *primers* utilizados na PCR foram desenhados como segue:

- *Primer forward*: 5'-CATTGTCTAAGCGGGACGG-3'; e
- *Primer reverse*: 5'-TGGTGGGGCTGCTATGTTTC-3'.

Foi preparada uma solução para a PCR com volume final de 15 µL por amostra, contendo: tampão 1X; cloreto de magnésio 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; *primer forward* 0,2 µM; *primer reverse* 0,2 µM; 0,5 U de enzima Taq polimerase; e 20 ng de DNA genômico. O produto de interesse amplificado nesta reação é de 239 pb (figura 7A).

Para a digestão enzimática foi preparada uma solução com volume final de 10 µL por amostra, contendo: tampão 1X; 2,5 U da enzima BstUI (BioLabs Inc.); e 1 µg do produto de PCR. As digestões foram feitas com incubação a 60 °C por uma hora e meia. A enzima BstUI cliva o produto da PCR que contém o alelo C em dois fragmentos de 176 pb e 63 pb. O produto da PCR contendo o alelo A não é clivado pela enzima, mantendo seu tamanho de 239 pb (figura 7B).

Figura 7 – Genotipagem do rs805304

A) Produtos da PCR com tamanho de 239 pb. **B)** Digestão enzimática dos produtos da PCR – a banda de 239 pb indica presença do alelo A e a banda de 176 pb indica a presença do alelo C – em branco são destacados os genótipos de controles positivos e em amarelo de amostras de pacientes. B, branco da PCR; L, *ladder* (padrão de peso molecular); pb, pares de base; CC, genótipo homozigoto ancestral; CA, genótipo heterozigoto; AA, genótipo homozigoto variante.

4.5.4 rs805305 do gene DDAH2 (C/G)

A genotipagem deste SNP foi realizada por PCR seguida de digestão enzimática. Os *primers* utilizados na PCR foram desenhados como segue:

- *Primer forward*: 5'-AAGAGGAGCCTGAGGAACAA-3'; e

– *Primer reverse*: 5'-GCGGAGAGAGGATGCTTAAC-3'.

As reações de PCR do rs805305 seguiram as mesmas condições descritas para o rs805304. O produto de interesse amplificado nesta reação é de 340 pb (figura 8A).

Para a digestão enzimática foi preparada uma solução com volume final de 10 µL por amostra, contendo: tampão 1X; 2U da enzima BstUI; e 1 µg do produto de PCR. As digestões foram feitas com incubação a 60 °C por uma hora e meia. A enzima BstUI cliva o produto da PCR que contém o alelo G em dois fragmentos de 190 pb e 150 pb. O produto da PCR contendo o alelo C não é clivado pela enzima, mantendo seu tamanho de 340 pb (figura 8B).

Figura 8 – Genotipagem do rs805305

A) Produtos da PCR com tamanho de 340 pb. **B)** Digestão enzimática dos produtos da PCR – a banda de 340 pb indica presença do alelo C e as bandas de 190 pb e 150 pb indicam a presença do alelo G – em branco são destacados os genótipos de controles positivos e em amarelo de amostras de pacientes. B, branco da PCR; L, *ladder* (padrão de peso molecular); pb, pares de base; CC, genótipo homozigoto ancestral; CG, genótipo heterozigoto; GG, genótipo homozigoto variante.

4.6 Análises estatísticas e inferência de haplótipos

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste t não pareado, teste Mann Whitney ou teste do qui-quadrado (χ^2), quando apropriado. O teste χ^2 também foi utilizado para analisar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e para comparar as frequências dos genótipos, alelos e haplótipos dos polimorfismos estudados entre grupos. Os valores das medidas de resposta ao sildenafil (Δ IIEF e Δ IIEF%) e dos *scores* IIEF pós-tratamento foram comparados entre portadores de diferentes genótipos, alelos e haplótipos através de teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ou teste Mann Whitney, quando apropriado.

A inferência dos haplótipos de cada gene foi realizada pelo programa PHASE 2.1. Os possíveis haplótipos para os dois SNPs estudados do *DDAH1* foram: TG, TA, CG e CA. Para o *DDAH2*, os possíveis haplótipos para os dois SNPs estudados foram: CC, CG, AC e AG. Haplótipos com frequência <1% nos dois grupos foram excluídos das análises estatísticas.

Finalmente, os efeitos dos genótipos, alelos e haplótipos sobre as medidas de resposta ao sildenafil e sobre a qualidade das respostas dos pacientes foram avaliados por análises de regressão linear multivariada e de regressão logística multivariada, respectivamente, utilizando o software JMP 13.0.0 (SAS Institute). As variáveis de importância clínica idade, diabetes, etilismo, tabagismo e uso de anti-hipertensivos e, também, os genótipos, alelos e haplótipos foram incluídos como variáveis independentes nos modelos de regressão linear e logística multivariadas. A fim de obter uma distribuição normal, os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e dos *scores* IIEF pós-tratamento foram transformados logaritmicamente e, então, incluídos como

variáveis dependentes para regressão linear multivariada. Para a regressão logística multivariada, a classificação como bons ou maus respondedores foi considerada como variável dependente. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos em todas as análises.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A tabela 3 sumariza as características clínicas e laboratoriais dos 140 indivíduos envolvidos no estudo que foram divididos em dois grupos, um com 70 pacientes com DEPP e outro com 70 pacientes com DEC. As características clínicas dos dois grupos foram muito similares, embora tenha havido diferença na idade, LDL e frequência de diabetes entre os grupos (todas $P < 0,05$; tabela 3). Essas diferenças não são muito relevantes, visto que este estudo visa avaliar em cada grupo, de maneira independente, a influência de polimorfismos genéticos das enzimas DDAH1 e DDAH2 sobre a resposta ao tratamento da DE com sildenafil. Também, houve diferença estatística significativa entre os valores médios de Δ IIEF% ($P < 0,05$; tabela 3), indicando que o grupo DEC teve uma melhor resposta ao sildenafil que o grupo DEPP, o que é coerente com o fato de que pacientes com DE decorrente da cirurgia de prostatectomia radical têm menor sucesso na terapia com fármacos inibidores da PDE-5.

Já na tabela 4 são apresentadas características clínicas e laboratoriais após a divisão dos pacientes de cada grupo em bons e maus respondedores ao sildenafil de acordo com a mediana dos valores de Δ IIEF% (resposta corrigida pelo grau de DE). Como esperado, visto que os pacientes foram divididos de acordo com tipo de resposta, nos dois grupos (DEPP e DEC) houve diferença significativa para os valores médios de *score* IIEF pós-tratamento e de Δ IIEF% entre bons e maus respondedores (todas $P < 0,05$; tabela 4). No grupo DEPP, bons respondedores apresentaram maiores valores de colesterol total, HDL e triglicerídeos (todos $P < 0,05$; tabela 4). Já no grupo DEC, interessante, observou-se que, apesar dos bons respondedores terem apresentado maior percentagem de tabagistas e de etilistas

(ambas $P < 0,05$; tabela 4), os quais são fatores que contribuem para o desenvolvimento de DE, os maus respondedores apresentaram maior idade, frequência de diabetes e grau de DE (menor *score* IIEF pré-tratamento) (todas $P < 0,05$; tabela 4), o que parece contribuir mais para uma pior resposta destes pacientes ao tratamento com sildenafil.

Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

Características	DEPP (n=70)	DEC (n=70)
Idade (anos)	65 ± 6	56 ± 11*
Etnia (brancos/não brancos)	33/37	36/34
IMC (Kg/m ²)	28,1 ± 4,4	28,7 ± 4,5
Praticam atividade física (%)	57	53
Tabagismo (%)		
Fumantes	10	19
Ex-fumantes	49	50
Não fumantes	41	31
Etilismo ^a (%)	14	10
PAS (mmHg)	145 ± 22	139 ± 18
PAD (mmHg)	93 ± 13	91 ± 11
Colesterol total (mg/dL)	174 ± 46	183 ± 36
Colesterol HDL (mg/dL)	40 ± 5	41 ± 8
Colesterol LDL (mg/dL)	99 ± 40	114 ± 33*
Triglicerídeos (mg/dL)	155 ± 85	143 ± 80
Glicose (mg/dL)	119 ± 40	118 ± 39
Ureia (mg/dL)	32 ± 13	33 ± 12
Creatinina (mg/dL)	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,4
Hipertensos (%)	54	47
Diabéticos (%)	20	43*
Score IIEF		
pré-tratamento	8,5 ± 5,6	9,3 ± 6,1
pós-tratamento	13,5 ± 8,0	16,2 ± 8,8
ΔIIEF%	24,3 ± 30,2	37,7 ± 35,5*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica; IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; IIEF, Índice Internacional de Função Erétil. ^a Consumo de etanol >30 g/dia. Dados expressos como média ± desvio padrão, valores absolutos ou frequências relativas (%). * P<0,05 versus DEPP.

Tabela 4 – Características clínicas e laboratoriais de bons e maus respondedores em cada grupo

Características	DEPP		DEC	
	BR (n=35)	MR(n=35)	BR (n=35)	MR (n=35)
Idade (anos)	65 ± 7	65 ± 6	53 ± 11	58 ± 10*
Etnia (brancos/não brancos)	16/19	17/18	18/17	18/17
IMC (Kg/m ²)	27,6 ± 3,7	28,6 ± 5,0	28,4 ± 4,7	28,9 ± 4,3
Praticam atividade física (%)	60	57		51
Tabagismo (%)				
Fumantes	11	9	26	11*
Ex-fumantes	43	54	45	55
Não fumantes	46	37	29	34
Etilismo ^a (%)	11	17	20	0*
PAS (mmHg)	147 ± 24	143 ± 20	137 ± 18	142 ± 18
PAD (mmHg)	93 ± 14	93 ± 11	91 ± 11	92 ± 11
Colesterol total (mg/dL)	188 ± 38	157 ± 52*	188 ± 37	176 ± 36
Colesterol HDL (mg/dL)	43 ± 3	36 ± 5*	40 ± 8	42 ± 9
Colesterol LDL (mg/dL)	102 ± 34	95 ± 48	111 ± 40	116 ± 27
Triglicerídeos (mg/dL)	183 ± 101	127 ± 61*	129 ± 46	156 ± 100
Glicose (mg/dL)	111 ± 20	126 ± 51	121 ± 43	116 ± 38
Ureia (mg/dL)	34 ± 17	31 ± 8	32 ± 8	34 ± 14
Creatinina (mg/dL)	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,4
Hipertensos (%)	57	57	43	51
Diabéticos (%)	23	17	34	51*
Score IIEF				
pré-tratamento	8,8 ± 6,4	8,1 ± 4,8	11,5 ± 6,6	7,2 ± 4,7*
pós-tratamento	18,3 ± 7,7	8,6 ± 4,7*	23,6 ± 5,1	8,9 ± 4,3*
ΔIIEF%	46,4 ± 28,7	2,2 ± 3,9*	68,5 ± 23,1	6,8 ± 8,1*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; IIEF, Índice Internacional de Função Erétil. ^a Consumo de etanol >30 g/dia. Dados expressos como média ± desvio padrão, valores absolutos ou frequências relativas (%).

* P<0,05 versus MR.

A tabela 5 apresenta as principais medicações utilizadas pelos pacientes dos dois grupos. Como esperado, observou-se um número alto de usuários de fármacos anti-hipertensivos, visto que cerca de 50% dos pacientes em ambos os grupos são hipertensos (54% no grupo DEPP e 47% no grupo DEC; tabela 3).

Tabela 5 – Principais medicações utilizadas pelos pacientes

Características	DEPP (n=70)	DEC (n=70)
Anti-hipertensivos	38	33
Hipoglicemiantes orais	10	19
Insulina	0	10*
Estatinas	5	9
AAS (antiagregante plaquetário)	5	16*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica; AAS, ácido acetilsalicílico. Anti-hipertensivos incluem: β -bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs), bloqueadores de canais de cálcio, diuréticos tiazídicos e antagonistas de receptor de angiotensina II. Hipoglicemiantes orais incluem: metformina, glibenclamida e clorpropamida. Dados expressos como valores absolutos. * $P < 0,05$ *versus* DEPP.

O grupo DEC apresentou diferença significativa no número de usuários de insulina, o que também era esperado já que este grupo apresenta maior frequência de indivíduos diabéticos em relação ao grupo DEPP. Ainda, o grupo DEC também apresentou maior número de usuários de antiagregante plaquetário quando comparado ao grupo DEPP, evidenciando a associação de doenças cardiovasculares com o desenvolvimento de DE clínica.

As tabelas 6, 7 e 8 mostram as distribuições dos genótipos, alelos e haplótipos, respectivamente, nos pacientes com DE pós-prostatectomia e nos pacientes com DE clínica. As frequências observadas dos genótipos de cada polimorfismo estudado nos grupos DEPP e DEC não apresentaram desvios em

relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (comparações feitas por teste χ^2 ; todas com $P > 0,05$; tabela 6).

Tabela 6 – Frequências dos genótipos nos grupos DEPP e DEC

SNP	Genótipo	DEPP (n=70)	DEC (n=70)	Teste χ^2	P
DDAH1					
rs1554597	TT	32 (0,46)	35 (0,50)	0,402	0,818
	TC	29 (0,41)	28 (0,40)		
	CC	9 (0,13)	7 (0,10)		
	P_{HW}	0,932	0,950		
rs18582	GG	9 (0,13)	6 (0,08)	0,882	0,643
	GA	33 (0,47)	32 (0,46)		
	AA	28 (0,40)	32 (0,46)		
	P_{HW}	0,996	0,925		
DDAH2					
rs805304	CC	18 (0,26)	18 (0,26)	2,654	0,265
	CA	29 (0,41)	37 (0,53)		
	AA	23 (0,33)	15 (0,21)		
	P_{HW}	0,593	0,944		
rs805305	CC	18 (0,26)	18 (0,26)	2,654	0,265
	CG	29 (0,41)	37 (0,53)		
	GG	23 (0,33)	15 (0,21)		
	P_{HW}	0,593	0,944		

SNP, *single nucleotide polymorphism*; DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica; P; valor de P da comparação entre os dois grupos; P_{HW}, valor de P referente ao equilíbrio de Hardy-Weinberg calculado independentemente para DEC e DEPP. Dados mostrados como n (frequências relativas).

Tabela 7 – Frequências dos alelos nos grupos DEPP e DEC

SNP	Alelo	DEPP (n=140)	DEC (n=140)	Teste χ^2	P
DDAH1					
rs1554597	T	93 (0,66)	98 (0,70)	0,412	0,521
	C	47 (0,34)	42 (0,30)		
rs18582	G	51 (0,36)	44 (0,31)	0,781	0,377
	A	89 (0,64)	96 (0,69)		
DDAH2					
rs805304	C	65 (0,46)	73 (0,52)	0,915	0,339
	A	75 (0,54)	67 (0,48)		
rs805305	C	65 (0,46)	73 (0,52)	0,915	0,339
	G	75 (0,54)	67 (0,48)		

SNP, *single nucleotide polymorphism*; DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Dados mostrados como n (frequências relativas).

Não houve nenhuma diferença significativa nas distribuições dos genótipos, alelos ou haplótipos entre os grupos. Coincidentemente, as frequências observadas para os genótipos e alelos dos polimorfismos do *DDAH2* (rs805304 e rs805305) são iguais. De fato, a partir do exame visual dos resultados das genotipagens dos pacientes, foi observada completa associação entre os alelos ancestrais (C e C) e entre os alelos variantes (A e G) dos dois SNPs em todas as amostras estudadas. Desta forma, podemos inferir, sem necessidade de softwares específicos, que estes polimorfismos estão em completo desequilíbrio de ligação ($r^2=1$) na amostra da população estudada.

Tabela 8 – Frequências estimadas dos haplótipos nos grupos DEPP e DEC

Gene	Haplótipo	DEPP (n=140)	DEC (n=140)	Teste χ^2	P
<i>DDAH1</i>	TG	11 (0,08)	6 (0,04)	1,997	0,573
	TA	84 (0,60)	92 (0,66)		
	CG	40 (0,28)	38 (0,27)		
	CA	5 (0,04)	4 (0,03)		
<i>DDAH2</i>	CC	63 (0,45)	74 (0,53)	1,729	0,189
	CG	0 (0,00)	0 (0,00)		
	AC	0 (0,00)	0 (0,00)		
	AG	77 (0,55)	66 (0,47)		

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Dados mostrados como n (frequências relativas). Haplótipos com frequência <1% foram excluídos das análises estatísticas.

As respostas ao tratamento da DE com o sildenafil dos pacientes DEPP e DEC foram avaliadas conforme descrito na metodologia (item 4.2). Foram analisadas as distribuições dos valores de Δ IIEF (diferença das pontuações do domínio FE do IIEF pré e pós-tratamento) de acordo com os genótipos (figuras 9 e 10), alelos (figuras 11 e 12) e haplótipos (figura 13) dos pacientes dos grupos DEPP e DEC.

Figura 9 – Δ IIEF x genótipos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH1*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. * $P < 0,05$ significativo.

Figura 10 – Δ IIEF x genótipos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

Figura 11 – Δ IIEF x alelos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH1*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Mann Whitney.

Figura 12 – Δ IIEF x alelos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Mann Whitney. * $P < 0,05$ significativo.

Figura 13 – Δ IIEF x haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (*DDAH1*) e Teste de Mann Whitney (*DDAH2*).

Os pacientes do grupo DEPP portadores do genótipo GG do rs18582 obtiveram maiores diferenças das pontuações pré e pós-tratamento ($P < 0,05$; figura 9). Ainda no grupo DEPP, os portadores dos alelos variantes dos rs805304 e rs805305 (A e G, respectivamente) apresentaram maiores valores de Δ IIEF (ambos $P = 0,013$; figura 12). Nenhuma outra diferença significativa foi observada.

Também foram analisadas as distribuições dos valores de Δ IIEF% (percentagem da máxima resposta possível atingida pelo paciente) de acordo com os genótipos (figuras 14 e 15), alelos (figuras 16 e 17) e haplótipos (figura 18) dos pacientes dos grupos DEPP e DEC.

Figura 14 – Δ IIEF% x genótipos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH1*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. * P<0,05 significativo.

Figura 15 – Δ IIEF% x genótipos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

Figura 16 – Δ IIEF% x alelos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH1*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Mann Whitney.

Figura 17 – Δ IIEF% x alelos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Mann Whitney. * $P < 0,05$ significativo.

Figura 18 – Δ IIEF% x haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (*DDAH1*) e Teste de Mann Whitney (*DDAH2*).

No grupo DEPP, assim como para os valores de Δ IIEF, foram observados maiores valores de Δ IIEF% para os pacientes portadores do genótipo GG do rs18582 ($P < 0,05$; figura 14) e dos alelos A do rs805304 e G do rs805305 (ambos $P = 0,026$; figura 17). O grupo DEC não apresentou diferenças significativas.

As pontuações no domínio FE do IIEF após o tratamento da DE com sildenafil (score IIEF pós-tratamento) foram comparadas entre os genótipos (figuras 19 e 20), alelos (figuras 21 e 22) e haplótipos (figura 23) dos pacientes DEPP e DEC.

Figura 19 – Score IIEF pós-tratamento x genótipos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH1*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

Figura 20 – Score IIEF pós-tratamento x genótipos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. * $P < 0,05$ significativo.

Figura 21 – Score IIEF pós-tratamento x alelos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH1*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Mann Whitney. * $P < 0,05$ significativo.

Figura 22 – Score IIEF pós-tratamento x alelos dos polimorfismos estudados do gene *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Mann Whitney. * $P < 0,05$ significativo.

Figura 23 – Score IIEF pós-tratamento x haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2*

DEPP, pacientes com disfunção erétil pós-prostatectomia; DEC, pacientes com disfunção erétil clínica. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (*DDAH1*) e Teste de Mann Whitney (*DDAH2*).

No grupo DEPP, foi observada diferença na distribuição das pontuações pós-tratamento dos pacientes entre os genótipos do rs805305 e do rs805304 (ambas $P=0,048$; figura 20), mas os pós-testes não revelaram quais genótipos são diferentes entre si. Ainda, pacientes portadores dos alelos A do rs805304 e G do rs805305 (ambos $P=0,027$; figura 22) obtiveram melhores pontuações pós-tratamento no domínio FE do IIEF. Já no grupo DEC, o alelo G do rs18582 foi associado a melhores pontuações no domínio FE do IIEF após o tratamento com sildenafil ($P=0,047$; figura 21). Não foram encontradas outras associações significativas.

A qualidade da resposta dos pacientes ao tratamento da DE com o sildenafil também foi avaliada pela divisão dos voluntários, em cada grupo, em bons

respondedores (BR) e maus respondedores (MR). As distribuições dos genótipos, alelos e haplótipos entre BR e MR do grupo de pacientes com DE pós-prostatectomia são mostradas nas tabelas 9, 10, e 11, respectivamente.

Analisando as tabelas referentes ao grupo DEPP, não foram encontradas associações significativas dos genótipos, alelos ou haplótipos com os grupos de bons ou maus respondedores ao tratamento da DE com sildenafil (todas $P > 0,05$; tabelas 9, 10 e 11).

Tabela 9 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE pós-prostatectomia

SNP	Genótipo	BR (n=35)	MR (n=35)	P	OR (IC 95%)
DDAH1					
rs1554597	TT	16 (0,46)	16 (0,46)	-	1,00 (referência)
	TC	12 (0,34)	17 (0,48)	0,138	1,42 (0,51 – 3,90)
	CC	7 (0,20)	2 (0,06)	0,500	0,29 (0,05 – 1,59)
Teste $\chi^2 = 3,640$					
P Geral = 0,162					
rs18582	GG	7 (0,20)	2 (0,06)	-	1,00 (referência)
	GA	13 (0,37)	20 (0,57)	0,041	5,39 (0,96 – 30,1)
	AA	15 (0,43)	13 (0,37)	0,198	3,03 (0,53 – 17,26)
Teste $\chi^2 = 4,405$					
P Geral = 0,111					
DDAH2					
rs805304	CC	7 (0,20)	11 (0,31)	-	1,00 (referência)
	CA	15 (0,43)	14 (0,40)	0,391	0,59 (0,18 – 1,96)
	AA	13 (0,37)	10 (0,29)	0,262	0,49 (0,14 – 1,72)
Teste $\chi^2 = 1,315$					
P Geral = 0,518					
rs805305	CC	7 (0,20)	11 (0,31)	-	1,00 (referência)
	CG	15 (0,43)	14 (0,40)	0,391	0,59 (0,18 – 1,96)
	GG	13 (0,37)	10 (0,29)	0,262	0,49 (0,14 – 1,72)
Teste $\chi^2 = 1,315$					
P Geral = 0,518					

SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). Dados mostrados como n (frequências relativas).

Tabela 10 – Distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE pós-prostatectomia

SNP	Alelo	BR (n=70)	MR (n=70)	P	OR (IC 95%)
DDAH1					
rs1554597	T	44 (0,63)	49 (0,70)	-	1,00 (referência)
	C	26 (0,37)	21 (0,30)	0,371	0,73 (0,36 – 1,47)
rs18582	G	27 (0,39)	24 (0,34)	-	1,00 (referência)
	A	43 (0,61)	46 (0,66)	0,598	1,20 (0,60 – 2,40)
DDAH2					
rs805304	C	29 (0,41)	36 (0,51)	-	1,00 (referência)
	A	41 (0,59)	34 (0,49)	0,236	0,67 (0,34 – 1,30)
rs805305	C	29 (0,41)	36 (0,51)	-	1,00 (referência)
	G	41 (0,59)	34 (0,49)	0,236	0,67 (0,34 – 1,30)

SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). Dados mostrados como n (frequências relativas).

Tabela 11 – Distribuição dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE pós-prostatectomia

Gene	HAP	BR (n=70)	MR (n=70)	P	OR (IC 95%)
<i>DDAH1</i>	TG	5 (0,07)	6 (0,09)	-	1,00 (referência)
	TA	41 (0,59)	43 (0,61)	0,834	0,87 (0,25 – 3,09)
	CG	22 (0,31)	18 (0,26)	0,574	0,68 (0,18 – 2,61)
	CA	2 (0,03)	3 (0,04)	0,839	1,25 (0,15 – 10,7)
Teste $\chi^2 = 0,738$					
P Geral = 0,864					
<i>DDAH2</i>	CC	34 (0,49)	29 (0,41)	-	1,00 (referência)
	AG	36 (0,51)	41 (0,59)	0,396	1,33 (0,69 – 2,60)

HAP, haplótipo; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. Dados mostrados como n (frequências relativas).

As distribuições dos genótipos, alelos e haplótipos entre bons e maus respondedores ao sildenafil dos pacientes com DE clínica são mostradas nas tabelas 12, 13, e 14, respectivamente.

Tabela 12 – Distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE clínica

SNP	Genótipo	BR (n=35)	MR (n=35)	P	OR (IC 95%)
DDAH1					
rs1554597	TT	15 (0,43)	20 (0,57)	-	1,00 (referência)
	TC	16 (0,46)	12 (0,34)	0,260	0,56 (0,21 – 1,54)
	CC	4 (0,11)	3 (0,09)	0,488	0,56 (0,11 – 2,90)
Teste $\chi^2 = 1,429$					
P Geral = 0,490					
rs18582	GG	3 (0,09)	3 (0,09)	-	1,00 (referência)
	GA	21 (0,60)	11(0,31)	0,467	0,52 (0,09 – 3,04)
	AA	11 (0,31)	21 (0,60)	0,467	1,91 (0,33 – 11,1)
Teste $\chi^2 = 6,250$					
P Geral = 0,044*					
DDAH2					
rs805304	CC	8 (0,23)	10 (0,29)	-	1,00 (referência)
	CA	18 (0,51)	19 (0,54)	0,770	0,84 (0,27 – 2,62)
	AA	9 (0,26)	6 (0,17)	0,373	0,53 (0,13 – 2,14)
Teste $\chi^2 = 0,849$					
P Geral = 0,654					
rs805305	CC	8 (0,23)	10 (0,29)	-	1,00 (referência)
	CG	18 (0,51)	19 (0,54)	0,770	0,84 (0,27 – 2,62)
	GG	9 (0,26)	6 (0,17)	0,373	0,53 (0,13 – 2,14)
Teste $\chi^2 = 0,849$					
P Geral = 0,654					

SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores. Dados mostrados como n (frequências relativas). OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%).* P<0,05 significativo.

Tabela 13 – Distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE clínica

SNP	Alelo	BR (n=70)	MR (n=70)	P	OR (IC 95%)
DDAH1					
rs1554597	T	46 (0,66)	52 (0,74)	-	1,00 (referência)
	C	24 (0,34)	18 (0,26)	0,269	0,66 (0,32 – 1,38)
rs18582	G	27 (0,39)	17 (0,34)	-	1,00 (referência)
	A	43 (0,61)	53 (0,66)	0,068	1,96 (0,95 – 4,06)
DDAH2					
rs805304	C	34 (0,49)	39 (0,56)	-	1,00 (referência)
	A	36 (0,51)	31 (0,44)	0,398	0,75 (0,39 – 1,46)
rs805305	C	34 (0,49)	39 (0,56)	-	1,00 (referência)
	G	36 (0,51)	31 (0,44)	0,398	0,75 (0,39 – 1,46)

SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). Dados mostrados como n (frequências relativas).

Tabela 14 – Distribuição dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo com DE clínica

Gene	HAP	BR (n=70)	MR (n=70)	P	OR (IC 95%)
<i>DDAH1</i>	TG	4 (0,06)	2 (0,03)	-	1,00 (referência)
	TA	42 (0,60)	50 (0,71)	0,318	2,38 (0,42 – 13,7)
	CG	23 (0,33)	15 (0,22)	0,774	1,30 (0,21 – 8,04)
	CA	1 (0,01)	3 (0,04)	0,197	6,0 (0,35 – 101,6)
Teste $\chi^2 = 4,047$					
P Geral = 0,257					
<i>DDAH2</i>	CC	38 (0,54)	36 (0,51)	-	1,00 (referência)
	AG	32 (0,46)	34 (0,49)	0,735	1,12 (0,58 – 2,18)

HAP, haplótipo; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. Dados mostrados como n (frequências relativas).

Para o grupo DEC, foi encontrada diferença na distribuição dos genótipos do rs18582 entre BR e MR ($P=0,044$; tabela 12). Entretanto, quando o genótipo ancestral (GG) foi comparado diretamente com o genótipo heterozigoto (GA) ou homozigoto variante (AA), nenhum genótipo foi associado a bons ou maus respondedores (ambos $P>0,05$; tabela 12). Ainda, o alelo A deste mesmo SNP apresentou tendência para associação com o grupo de maus respondedores ao sildenafil ($P=0,068$; OR=1,96; IC=0,95 – 4,06; tabela 13). Não foram encontradas outras associações significativas.

A fim de corrigir os resultados encontrados para possíveis fatores de confusão, foram realizadas análises de regressão linear multivariada. Os efeitos dos genótipos, alelos e haplótipos dos pacientes com DE pós-prostatectomia sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e *score* IIEF pós-tratamento corrigidos pelas características de relevância clínica (idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos), são mostrados nas tabelas 15, 16 e 17, respectivamente.

Após as análises de regressão linear multivariada, o genótipo homozigoto CC do rs805304 foi associado a menores valores de Δ IIEF (β -0,20; $P=0,025$; tabela 15), enquanto o genótipo homozigoto AA foi associado a maiores valores de Δ IIEF (β 0,19; $P=0,027$; tabela 15). Referente ainda ao rs805304, o alelo ancestral C e o alelo variante A o obtiveram associação negativa e positiva, respectivamente, com os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e *score* IIEF pós-tratamento (Δ IIEF, β -0,11 e 0,11 - $P=0,007$; Δ IIEF%, β -0,15 e 0,15 - $P=0,025$; e *score* IIEF pós-tratamento, β -0,06 e 0,06 - $P=0,014$; tabela 16). Não foram encontradas outras associações significativas.

Tabela 15 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEPP

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,25$	RMSE = 0,46	$R^2 = 0,19$	RMSE = 0,75	$R^2 = 0,20$	RMSE = 0,28
	β	P	β	P	β	P
Idade	0,01	0,145	0,02	0,255	0,01	0,147
Etilismo ^a	-0,10	0,254	-0,15	0,297	-0,04	0,502
Tabagismo						
Fumante	0,14	0,308	0,20	0,395	0,05	0,608
Ex-fumante	-0,15	0,132	-0,22	0,161	-0,06	0,356
Não fumante	0,00	0,978	0,03	0,855	0,01	0,852
Ser diabético	-0,08	0,285	-0,10	0,415	-0,05	0,312
Usar anti-hipertensivo(s)	-0,03	0,684	-0,05	0,617	-0,01	0,721
DDAH1						
rs1554597	P Geral = 0,726		P Geral = 0,692		P Geral = 0,768	
TT	-0,10	0,520	-0,23	0,393	-0,07	0,475
TC	-0,09	0,483	-0,08	0,722	-0,03	0,697
CC	0,20	0,430	0,31	0,458	0,10	0,503

(continua)

(conclusão)

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,25$	RMSE = 0,46	$R^2 = 0,19$	RMSE = 0,75	$R^2 = 0,20$	RMSE = 0,28
	β	P	β	P	β	P
rs18582	P Geral = 0,167		P Geral = 0,225		P Geral = 0,413	
GG	0,00	0,995	-0,01	0,981	0,02	0,907
GA	-0,15	0,257	-0,22	0,314	-0,07	0,378
AA	0,15	0,366	0,23	0,396	0,05	0,596
DDAH2						
rs805304	P Geral = 0,042*		P Geral = 0,105		P Geral = 0,053	
CC	-0,20	0,025*	-0,29	0,048	-0,08	0,152
CA	0,02	0,845	0,05	0,700	-0,05	0,331
AA	0,19	0,027*	0,24	0,079	0,13	0,016
rs805305 ^b	-	-	-	-	-	-

R^2 , parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. ^a Consumo de etanol >30 g/dia. ^b Considerado pelo software igual ao rs805304, devido ao desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$). n = 70. * P<0,05 significativo.

Tabela 16 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos alelos dos polimorfismos estudados sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEPP

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,10$	RMSE = 0,48	$R^2 = 0,08$	RMSE = 0,75	$R^2 = 0,10$	RMSE = 0,28
	β	P	β	P	β	P
Idade	0,01	0,169	0,01	0,274	0,01	0,171
Etilismo ^a	-0,06	0,344	-0,09	0,381	-0,02	0,528
Tabagismo						
Fumante	0,08	0,407	0,12	0,455	0,02	0,710
Ex-fumante	-0,10	0,126	-0,17	0,129	-0,04	0,311
Não fumante	0,02	0,721	0,05	0,638	0,02	0,614
Ser diabético	-0,06	0,232	-0,07	0,398	-0,03	0,280
Usar anti-hipertensivo(s)	-0,05	0,202	-0,08	0,236	-0,03	0,256
DDAH1						
rs1554597						
T	-0,01	0,857	-0,04	0,560	-0,03	0,336
C	0,01	0,857	0,04	0,560	0,03	0,336

(continua)

(conclusão)

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,10$	RMSE = 0,48	$R^2 = 0,08$	RMSE = 0,75	$R^2 = 0,10$	RMSE = 0,28
	β	P	β	P	β	P
rs18582						
G	0,02	0,682	0,04	0,584	0,03	0,258
A	-0,02	0,682	-0,04	0,584	-0,03	0,258
DDAH2						
rs805304						
C	-0,11	0,007*	-0,15	0,025*	-0,06	0,014*
A	0,11	0,007*	0,15	0,025*	0,06	0,014*
rs805305 ^b						
	-	-	-	-	-	-

R^2 , parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. ^a Consumo de etanol >30 g/dia. ^b Considerado pelo software igual ao rs805304, devido ao desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$). n = 140. * P<0,05 significativo.

Tabela 17 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEPP

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,05$	RMSE = 0,48	$R^2 = 0,04$	RMSE = 0,77	$R^2 = 0,05$	RMSE = 0,29
	β	P	β	P	β	P
Idade	0,01	0,195	0,01	0,262	0,01	0,130
Etilismo ^a	-0,07	0,298	-0,10	0,307	-0,04	0,311
Tabagismo						
Fumante	0,10	0,344	0,16	0,311	0,06	0,345
Ex-fumante	-0,09	0,193	-0,17	0,133	-0,06	0,196
Não fumante	-0,00	0,971	0,01	0,931	-0,00	0,969
Ser diabético	-0,06	0,263	-0,07	0,393	-0,04	0,225
Usar anti-hipertensivo(s)	-0,06	0,175	-0,08	0,262	-0,02	0,470
<i>DDAH1</i>	P Geral = 0,747		P Geral = 0,820		P Geral = 0,758	
TG	-0,03	0,816	-0,09	0,657	-0,05	0,497
TA	-0,02	0,764	-0,01	0,948	0,04	0,399
CG	0,08	0,379	0,12	0,418	0,00	0,974
CA	-0,03	0,885	-0,02	0,950	0,01	0,925

(continua)

(conclusão)

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,05$	RMSE = 0,48	$R^2 = 0,04$	RMSE = 0,77	$R^2 = 0,05$	RMSE = 0,29
	β	P	β	P	β	P
<i>DDAH2</i>						
CC	0,01	0,913	-0,02	0,817	-0,03	0,344
AG	-0,01	0,913	0,02	0,817	0,03	0,344

R^2 , parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. ^a Consumo de etanol >30 g/dia. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. n = 140.

Os efeitos dos genótipos, alelos e haplótipos dos pacientes com DE clínica sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento corrigidos pelas características de relevância clínica (idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos), são mostrados nas tabelas 18, 19 e 20, respectivamente. Entretanto, não foi encontrada nenhuma associação significativa.

Tabela 18 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEC

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,20$	RMSE = 0,47	$R^2 = 0,19$	RMSE = 0,76	$R^2 = 0,20$	RMSE = 0,30
	β	P	β	P	β	P
Idade	0,00	0,950	-0,01	0,566	-0,01	0,184
Etilismo ^a	0,13	0,224	0,21	0,230	0,06	0,423
Tabagismo						
Fumante	0,18	0,113	0,17	0,346	-0,01	0,890
Ex-fumante	-0,08	0,357	-0,07	0,593	0,02	0,653
Não fumante	-0,10	0,282	-0,10	0,519	-0,01	0,818
Ser diabético	-0,05	0,407	-0,09	0,370	-0,05	0,184
Usar anti-hipertensivo(s)	0,04	0,569	0,04	0,696	-0,02	0,563
DDAH1						
rs1554597	P Geral = 0,562		P Geral = 0,716		P Geral = 0,423	
TT	0,14	0,387	0,19	0,465	0,10	0,327
TC	-0,09	0,485	-0,09	0,675	0,07	0,429
CC	-0,05	0,805	-0,10	0,749	-0,17	0,191

(continua)

(conclusão)

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,20$	RMSE = 0,47	$R^2 = 0,19$	RMSE = 0,76	$R^2 = 0,20$	RMSE = 0,30
	β	P	β	P	β	P
rs18582	P Geral = 0,088		P Geral = 0,136		P Geral = 0,297	
GG	-0,03	0,892	-0,08	0,823	0,21	0,140
GA	0,23	0,067	0,36	0,087	-0,04	0,606
AA	-0,20	0,237	-0,28	0,326	-0,16	0,138
DDAH2						
rs805304	P Geral = 0,476		P Geral = 0,631		P Geral = 0,643	
CC	-0,11	0,288	-0,14	0,409	-0,06	0,365
CA	0,07	0,372	0,10	0,476	0,03	0,614
AA	0,04	0,740	0,04	0,808	0,03	0,635
rs805305 ^b	-	-	-	-	-	-

R^2 , parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. ^a Consumo de etanol >30 g/dia. ^b Considerado pelo software igual ao rs805304, devido ao desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$). n = 70.

Tabela 19 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos alelos dos polimorfismos estudados sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEC

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,12$	RMSE = 0,46	$R^2 = 0,11$	RMSE = 0,75	$R^2 = 0,16$	RMSE = 0,28
	β	P	β	P	β	P
Idade	-0,00	0,925	-0,01	0,328	-0,01	0,030*
Etilismo ^a	0,16	0,028*	0,25	0,034*	0,07	0,143
Tabagismo						
Fumante	0,14	0,052	0,13	0,271	-0,03	0,585
Ex-fumante	-0,09	0,116	-0,10	0,275	0,03	0,375
Não fumante	-0,06	0,381	-0,03	0,759	-0,01	0,875
Ser diabético	-0,07	0,105	-0,12	0,095	-0,06	0,033*
Usar anti-hipertensivo(s)	0,05	0,300	0,05	0,462	-0,02	0,530
DDAH1						
rs1554597						
T	-0,00	0,962	-0,01	0,929	-0,01	0,831
C	0,00	0,962	0,01	0,929	0,01	0,831

(continua)

(conclusão)

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,12$	RMSE = 0,46	$R^2 = 0,11$	RMSE = 0,75	$R^2 = 0,16$	RMSE = 0,28
	β	P	β	P	β	P
rs18582						
G	0,05	0,255	0,07	0,336	0,04	0,194
A	-0,05	0,255	-0,07	0,336	-0,04	0,194
DDAH2						
rs805304						
C	-0,05	0,290	-0,05	0,452	-0,02	0,388
A	0,05	0,290	0,05	0,452	0,02	0,388
rs805305 ^b						
	-	-	-	-	-	-

R^2 , parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. ^a Consumo de etanol >30 g/dia. ^b Considerado pelo software igual ao rs805304, devido ao desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$). n = 140. * P<0,05 significativo.

Tabela 20 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre os valores de Δ IIEF, Δ IIEF% e score IIEF pós-tratamento no grupo DEC

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,11$	RMSE = 0,46	$R^2 = 0,11$	RMSE = 0,75	$R^2 = 0,17$	RMSE = 0,28
	β	P	β	P	β	P
Idade	-0,00	0,950	-0,01	0,411	-0,01	0,041*
Etilismo ^a	0,16	0,026*	0,26	0,032*	0,07	0,125
Tabagismo						
Fumante	0,12	0,083	0,10	0,389	-0,04	0,420
Ex-fumante	-0,08	0,138	-0,10	0,295	0,03	0,388
Não fumante	-0,04	0,527	-0,00	0,974	0,01	0,891
Ser diabético	-0,07	0,086	-0,12	0,075	-0,06	0,023*
Usar anti-hipertensivo(s)	0,05	0,296	0,05	0,470	-0,02	0,503
<i>DDAH1</i>	P Geral = 0,562		P Geral = 0,660		P Geral = 0,473	
TG	0,16	0,333	0,20	0,434	0,09	0,384
TA	-0,01	0,950	0,02	0,889	0,02	0,683
CG	0,04	0,660	0,11	0,482	0,06	0,320
CA	-0,19	0,299	-0,34	0,264	-0,17	0,140

(continua)

(conclusão)

Modelo	Δ IIEF		Δ IIEF%		score IIEF pós-tratamento	
	$R^2 = 0,11$	RMSE = 0,46	$R^2 = 0,11$	RMSE = 0,75	$R^2 = 0,17$	RMSE = 0,28
	β	P	β	P	β	P
<i>DDAH2</i>						
CC	-0,01	0,850	0,02	0,811	-0,02	0,516
AG	0,01	0,850	-0,02	0,811	0,02	0,516

R^2 , parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. ^a Consumo de etanol >30 g/dia. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. n = 140. * P<0,05 significativo.

Finalmente, análises de regressão logística multivariada foram utilizadas para corrigir pelos possíveis fatores de confusão os efeitos dos genótipos, alelos e haplótipos sobre a qualidade da resposta dos pacientes ao tratamento com sildenafil nos grupos com DE pós-prostatectomia e DE clínica.

As tabelas 21, 22 e 23 apresentam, respectivamente, as associações dos genótipos, alelos e haplótipos com bons e maus respondedores ao sildenafil do grupo DEPP, corrigidas para as variáveis de relevância clínica (idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos). Entretanto, não foram encontradas associações significativas em nenhuma destas análises.

Tabela 21 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEPP

SNP	Genótipo	BR (n=35)	MR (n=35)	P	OR (IC 95%)
DDAH1					
rs1554597	TT	16 (0,46)	16 (0,46)	-	1,00 (referência)
	TC	12 (0,34)	17 (0,48)	0,782	0,82 (0,20 – 3,41)
	CC	7 (0,20)	2 (0,06)	0,465	0,27 (0,01 – 9,15)
P Geral = 0,765					
rs18582	GG	7 (0,20)	2 (0,06)	-	1,00 (referência)
	GA	13 (0,37)	20 (0,57)	0,621	2,23 (0,09 – 53,75)
	AA	15 (0,43)	13 (0,37)	0,896	0,79 (0,02 – 26,45)
P Geral = 0,331					
DDAH2					
rs805304	CC	7 (0,20)	11 (0,31)	-	1,00 (referência)
	CA	15 (0,43)	14 (0,40)	0,259	0,46 (0,12 – 1,78)
	AA	13 (0,37)	10 (0,29)	0,202	0,40 (0,10 – 1,63)
P Geral = 0,396					
rs805305 ^b	-	-	-	-	-

R²: 0,11. SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). ^b Considerado pelo software igual ao rs805304, devido ao desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$). Dados mostrados como n (frequências relativas). Modelo corrigido para idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos.

Tabela 22 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEPP

SNP	Alelo	BR (n=70)	MR (n=70)	P	OR (IC 95%)
DDAH1					
rs1554597	T	44 (0,63)	49 (0,70)	-	1,00 (referência)
	C	26 (0,37)	21 (0,30)	0,548	0,79 (0,37 – 1,69)
rs18582	G	27 (0,39)	24 (0,34)	-	1,00 (referência)
	A	43 (0,61)	46 (0,66)	0,649	1,19 (0,60 – 2,47)
DDAH2					
rs805304	C	29 (0,41)	36 (0,51)	-	1,00 (referência)
	A	41 (0,59)	34 (0,49)	0,195	0,62 (0,30 – 1,28)
rs805305 ^b	-	-	-	-	-

R²: 0,05. SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). ^b Considerado pelo software igual ao rs805304, devido ao desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$). Dados mostrados como n (frequências relativas). Modelo corrigido para idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos.

Tabela 23 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEPP

Gene	HAP	BR (n=70)	MR (n=70)	P	OR (IC 95%)
<i>DDAH1</i>	TG	5 (0,07)	6 (0,09)	-	1,00 (referência)
	TA	41 (0,59)	43 (0,61)	0,887	0,91 (0,24 – 3,47)
	CG	22 (0,31)	18 (0,26)	0,540	0,64 (0,16 – 2,64)
	CA	2 (0,03)	3 (0,04)	0,792	1,36 (0,14 – 13,12)
P Geral = 0,785					
<i>DDAH2</i>	CC	34 (0,49)	29 (0,41)	-	1,00 (referência)
	AG	36 (0,51)	41 (0,59)	0,543	1,26 (0,60 – 2,64)

R²: 0,04. SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. Dados mostrados como n (frequências relativas). Modelo corrigido para idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos.

As associações dos genótipos, alelos e haplótipos com bons e maus respondedores ao sildenafil do grupo DEC, corrigidas para as variáveis de relevância clínica, são mostradas nas tabelas 24, 25 e 26, respectivamente.

Tabela 24 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEC

SNP	Genótipo	BR (n=35)	MR (n=35)	P	OR (IC 95%)
DDAH1					
rs1554597	TT	15 (0,43)	20 (0,57)	-	1,00 (referência)
	TC	16 (0,46)	12 (0,34)	0,787	1,41 (0,12 – 17,04)
	CC	4 (0,11)	3 (0,09)	0,912	1,22 (0,04 – 41,87)
P Geral = 0,962					
rs18582	GG	3 (0,09)	3 (0,09)	-	1,00 (referência)
	GA	21 (0,60)	11(0,31)	0,462	0,31 (0,01 – 7,03)
	AA	11 (0,31)	21 (0,60)	0,707	2,10 (0,04 – 101,2)
P Geral = 0,240					
DDAH2					
rs805304	CC	8 (0,23)	10 (0,29)	-	1,00 (referência)
	CA	18 (0,51)	19 (0,54)	0,103	0,24 (0,05 – 1,33)
	AA	9 (0,26)	6 (0,17)	0,079	0,15 (0,02 – 1,24)
P Geral = 0,179					
rs805305 ^b	-	-	-	-	-

R²: 0,26. SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). ^b Considerado pelo software igual ao rs805304, devido ao desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$). Dados mostrados como n (frequências relativas). Modelo corrigido para idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos.

Tabela 25 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEC

SNP	Alelo	BR (n=70)	MR (n=70)	P	OR (IC 95%)
DDAH1					
rs1554597	T	46 (0,66)	52 (0,74)	-	1,00 (referência)
	C	24 (0,34)	18 (0,26)	0,391	0,70 (0,30 – 1,59)
rs18582	G	27 (0,39)	17 (0,34)	-	1,00 (referência)
	A	43 (0,61)	53 (0,66)	0,058	2,31 (0,97 – 5,5)2)
DDAH2					
rs805304	C	34 (0,49)	39 (0,56)	-	1,00 (referência)
	A	36 (0,51)	31 (0,44)	0,099	0,48 (0,20 – 1,15)
rs805305 ^b		-	-	-	-

R²: 0,20. SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). ^b Considerado pelo software igual ao rs805304, devido ao desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$). Dados mostrados como n (frequências relativas). Modelo corrigido para idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos.

Tabela 26 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* entre pacientes BR e MR ao sildenafil do grupo DEC

Gene	HAP	BR (n=70)	MR (n=70)	P	OR (IC 95%)
<i>DDAH1</i>	TG	4 (0,06)	2 (0,03)	-	1,00 (referência)
	TA	42 (0,60)	50 (0,71)	0,622	1,68 (0,21 – 13,29)
	CG	23 (0,33)	15 (0,22)	0,901	0,87 (0,10 – 7,38)
	CA	1 (0,01)	3 (0,04)	0,506	2,85 (0,13 – 62,94)
P Geral = 0,472					
<i>DDAH2</i>	CC	38 (0,54)	36 (0,51)	-	1,00 (referência)
	AG	32 (0,46)	34 (0,49)	0,544	1,27 (0,58 – 2,79)

R²: 0,18. SNP, *single nucleotide polymorphism*; BR, bons respondedores; MR, maus respondedores; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança (95%). Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <1%. Dados mostrados como n (frequências relativas). Modelo corrigido para idade, etilismo, tabagismo, diabetes e uso de anti-hipertensivos.

No grupo DEC, foi encontrada uma tendência para associação do alelo A do rs18582 com o grupo de maus respondedores, tendo os portadores deste alelo 131% a mais de chance de responderem mal ao tratamento com o sildenafil (P=0,058; OR=2,31; IC=0,97 – 5,52; tabela 25). Nenhuma outra associação significativa foi encontrada.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos neste estudo são descritos abaixo (figura 24):

- a) Nos pacientes do grupo DEC o polimorfismo rs18582 apresentou distribuição diferente entre bons e maus respondedores e o alelo variante A do rs18582 apresentou tendência para associação com uma maior chance de responder mal ao tratamento com sildenafil; estes resultados também tiveram associação próxima à significância ($P=0,088$) nos modelos de regressão multivariada (Δ IIEF);
- b) Pacientes do grupo DEPP portadores dos alelos variantes A e G dos rs805304 e rs805305, respectivamente, obtiveram melhores respostas ao sildenafil nas três formas de avaliação empregada (Δ IIEF, Δ IIEF% e *score* IIEF pós-tratamento), e estes resultados foram confirmados nos modelos de regressão linear multivariada (na distribuição dos genótipos só observamos associação dos polimorfismos com o Δ IIEF, mas de forma consistente com o descrito anteriormente);
- c) O rs1554597 e os haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* não foram associados a alterações nas respostas ao sildenafil no tratamento da DE.

Figura 24 – Resumo dos principais resultados obtidos

Esquema resumindo os principais resultados obtidos para cada grupo. No grupo DEPP, os alelos variantes A e G (relacionados a uma menor concentração plasmática de ADMA) dos rs805304 e rs805305, respectivamente, do gene *DDAH2* foram associados a uma melhor resposta ao sildenafil. Já no grupo DEC, o alelo variante A (também relacionado a uma menor concentração plasmática de ADMA) do rs18582 do gene *DDAH1* foi associado a uma pior resposta ao sildenafil. Nos dois grupos, não foram encontradas outras associações significativas.

A ADMA é uma importante molécula inibidora endógena das enzimas NOS, responsáveis pela produção de NO, e já foi associada à função erétil prejudicada,⁴⁶ DE arteriogênica⁷⁰ e diversas doenças relacionadas com a DE como hipertensão, DM e doenças cardiovasculares.¹²¹ O NO é o principal mediador químico responsável pelo início e manutenção da ereção peniana, através da via do GMPc. Este último é alvo de ação da PDE-5 que o converte em 5'GMP, encerrando a ereção.^{7; 18} A PDE-5 é inibida pelo sildenafil, facilitando e prolongando o processo de ereção.¹¹¹ As enzimas DDAH1 e a DDAH2 metabolizam a ADMA e polimorfismos nos genes codificantes destas proteínas podem alterar a concentração deste metabólito, influenciando a produção de NO, que é essencial para a ereção peniana e para a resposta ao sildenafil.

Não há estudos de associação do rs1554597 (polimorfismo do *DDAH1*) com a DE ou com outras doenças ligadas a fisiopatologia da DE. No entanto, o alelo variante C deste SNP foi fortemente relacionado a maiores concentrações plasmáticas de ADMA em um estudo de associação pangenômica (*genome-wide association study*, GWAS)¹⁰⁰ e em pacientes com diabetes tipo 2.⁹⁴ Apesar disso, no presente trabalho, este polimorfismo não foi associado a diferenças nas respostas ao sildenafil em nenhum dos grupos estudados (DEPP e DEC). Sabemos que a atividade e/ou expressão da DDAH1 são reguladas não apenas por características genéticas, mas também por outros fatores como NADPHox, Ang II, LDL oxidada, TNF- α , IL-1 β , disponibilidade de L-arginina, S-nitrosilação pelo NO, EROs e outros.^{42; 53; 54; 56; 57; 58} Em diferentes condições patológicas, estes fatores podem estar alterados, sendo capazes de modificar (atenuar, intensificar ou ocultar) o efeito de polimorfismos do *DDAH1* sobre a metabolização da ADMA.

Outro polimorfismo do gene *DDAH1*, o rs18582, teve o genótipo GG associado a maiores concentrações circulantes de ADMA em dois estudos do tipo GWAS.^{100; 101} Sendo assim, é possível que pacientes com DE portadores dos genótipos GA e AA deste SNP possuam menores concentrações circulantes de ADMA e, conseqüentemente, uma maior produção de NO. Estudos anteriores demonstraram que maiores concentrações plasmáticas de nitrito foram correlacionadas com piores respostas ao sildenafil⁸⁹ e que SNPs relacionados a uma menor produção de NO foram associados a melhores respostas ao sildenafil no tratamento da DE.^{118; 119} De forma consistente, no presente estudo foi encontrada uma tendência para associação do alelo A do rs18582 ao grupo de maus respondedores ao sildenafil dos pacientes com DEC. Para os pacientes com DEPP, a análise estatística básica demonstrou que os portadores do genótipo GG obtiveram melhores respostas ao sildenafil que os pacientes portadores do genótipo GA, entretanto, esse resultado não se manteve após a correção pelos fatores de confusão na análise de regressão linear multivariada.

Os achados mencionados acima parecem um paradoxo já que a sinalização mediada pelo NO é necessária para a eficácia do sildenafil no tratamento da DE. Sabendo que o estresse oxidativo está relacionado à fisiopatologia da DE,^{122; 123; 124} uma sugestão para explicar os resultados encontrados é que uma suposta menor concentração plasmática de ADMA em pacientes portadores do alelo A do rs18582 geraria uma maior produção de NO, o qual é capaz de reagir com o ânion superóxido (O_2^-) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$),¹²⁵ uma molécula extremamente deletéria, que poderia causar danos teciduais, comprometendo a responsividade destes pacientes ao sildenafil. Interessantemente, um estudo demonstrou que no pênis de ratos diabéticos ocorreu uma degeneração seletiva de nervos nitrérgicos

dependente de NO e que o tratamento desses ratos com *N^G-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME), um inibidor da NOS, impediu a degeneração desses nervos.¹²⁶ Ferrini et. al. mostraram que o envelhecimento no pênis de ratos é acompanhado por uma indução da iNOS e formação de peroxinitrito causando apoptose, proteólise e reduzindo a relação músculo liso/colágeno no pênis, o que seria deletério à função erétil.¹²⁷ Além disso, o peroxinitrito tem sido implicado na patogênese de várias doenças como diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas,¹²⁸ as quais já foram amplamente associadas à DE.³ Juntas, estas evidências fundamentam a sugestão de que a associação do alelo A do rs18582 com piores respostas ao sildenafil no tratamento de DE é decorrente de dano tecidual causado pela formação de peroxinitrito.

Conforme sugerido por Lacchini et. al., esse paradoxo também pode ser explicado pela sensibilização dos receptores de NO.¹¹⁹ Resultados anteriores demonstraram que em camundongos knockout para o gene da eNOS o sildenafil prolongou a ereção peniana em comparação com os controles.¹²⁹ Além disso, após o tratamento com nitroprussiato de sódio, um maior relaxamento muscular cavernoso foi observado em camundongos knockout para os genes da eNOS e nNOS, mostrando maior sensibilidade para o NO.¹³⁰ Ainda, a superexpressão da enzima eNOS leva à tolerância a nitratos e reduzida reatividade vascular ao NO.¹³¹ Desta forma, os indivíduos com maior produção endógena de NO podem ser menos sensíveis ao sildenafil e vice-versa.

No presente trabalho, foi observado que os rs805304 e rs805305 estão em completo desequilíbrio de ligação ($r^2=1$) na amostra da população estudada e, portanto, as associações encontradas foram iguais para os dois SNPs. O forte desequilíbrio de ligação entre estes polimorfismos do *DDAH2* já foi observado em

estudos prévios.^{102; 103; 132} Os resultados deste estudo revelaram associação dos alelos variantes A e G (rs805304 e rs805305, respectivamente) com melhores respostas ao sildenafil no grupo DEPP. Estes resultados foram bastante consistentes, visto que ocorreu associação não só com a medida direta da resposta (Δ IIEF), mas também com a medida do percentual da resposta máxima que cada paciente poderia atingir (Δ IIEF%) e com a pontuação no IIEF após o tratamento com sildenafil, a qual reflete se o paciente obteve sucesso com a terapia.

Até o presente momento, não existem estudos descrevendo a associação dos rs805304 e 805305 com o risco para a DE ou com a responsividade ao tratamento farmacológico desta doença. Contudo, estes dois polimorfismos já foram associados a outras doenças relacionadas à DE. Os genótipos homozigotos AA e GG destes dois SNPs (rs805304 e rs805305, respectivamente) foram associados com maior risco para hipertensão arterial.¹⁰² Ainda, um estudo na população egípcia com homens entre 35 e 50 anos revelou um maior risco para doenças cardiovasculares nos portadores destes dois genótipos (AA e GG).¹⁰³ Entretanto, o rs805304 não foi associado com diabetes tipo 2 nem com hipertensão na população coreana,¹³³ e o rs805305 não foi associado à doença arterial coronariana em dois estudos diferentes na população chinesa.^{109; 134} Também na população chinesa, Bay et. al. relacionaram o alelo ancestral C do rs805305 com risco reduzido para hemorragia cerebral, mas não encontraram relação deste polimorfismo com acidente vascular cerebral aterotrombótico.¹⁰⁶ Já na população mexicana, o alelo C do rs805304 foi associado a um risco reduzido para infarto do miocárdio e obesidade, enquanto o rs805305 não apresentou associação com estas doenças, mesmo estando em desequilíbrio de ligação com o outro polimorfismo ($r^2=0,8$).¹⁰⁴

Quanto a associação destes SNPs com as concentrações circulantes de ADMA, Marra et al. relacionaram o alelo ancestral C do rs805304 com maiores concentrações plasmáticas de ADMA em pacientes diabéticos tipo 2 com insuficiência renal crônica.¹⁰⁵ O rs805305 teve o alelo variante G associado a concentrações circulantes aumentadas de ADMA em pacientes com choque séptico¹⁰⁷ e em pacientes com doença arterial coronariana.¹⁰⁹ Porém, em pacientes pediátricos com choque séptico este mesmo alelo foi associado a menores concentrações plasmáticas de ADMA.¹⁰⁸

Os estudos descritos acima apresentaram resultados conflitantes quanto às associações dos SNPs rs805304 e rs805305 com doenças e/ou com alterações das concentrações circulantes de ADMA, o que dificulta a interpretação das associações encontradas para estes polimorfismos no presente estudo. Esses conflitos podem ser consequência do fato de que a DDAH2 não é a principal isoforma que controla o metabolismo de ADMA sistêmico, mas sim a DDAH1.^{50; 135} Além disso, fatores que regulem a atividade e/ou expressão da DDAH2 (NADPHox, Ang II, glicose alta, baixa pO₂, disponibilidade de L-arginina, S-nitrosilação pelo NO, EROs e outros^{42; 53; 54; 56; 57; 58}) podem ser capazes de modificar o efeito de polimorfismos do *DDAH2* sobre a metabolização de ADMA em diferentes doenças ou, até mesmo, em populações distintas.¹⁰⁸

O fato de que as associações SNPs do *DDAH2* com melhores respostas ao sildenafil foram encontradas apenas no grupo DEPP é curioso, mas, talvez, possa ser explicado com base na fisiopatologia da DE neurogênica. Sabendo que o sildenafil depende do NO residual produzido pelo endotélio e/ou pelas fibras NANC para exercer seus efeitos,¹⁶ é provável que pacientes com DE pós-prostatectomia, cujas terminações nervosas NANC tenham sido lesionadas durante a cirurgia,^{136; 137}

dependam mais da produção endotelial de NO para responderem ao sildenafil e terem uma ereção peniana satisfatória. Como já mencionado, a enzima DDAH2 é encontrada principalmente em tecidos que expressam a enzima eNOS, como o endotélio vascular,^{41; 43} tendo papel na promoção da angiogênese, preservação da função endotelial nos vasos de resistência e na vasodilatação dependente de acetilcolina.^{42; 47; 48; 49; 50} Unindo estes fatos às evidências de que alelos variantes A e G dos SNPs rs805304 e rs805305, respectivamente, estejam relacionados a menores concentrações circulantes de ADMA,^{105; 108} sugere-se que os pacientes com DEPP portadores destes alelos tenham metabolização aumentada de ADMA no endotélio vascular, refletindo em maior produção endotelial de NO e, conseqüentemente, em melhores respostas ao tratamento com sildenafil.

Este foi o primeiro estudo que avaliou a possível influência de polimorfismos genéticos e haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* na resposta ao tratamento da DE com sildenafil. A análise de haplótipos pode ter maior contribuição na associação à susceptibilidade de doenças do que a análise de polimorfismos isolados.⁹¹ No entanto, o presente trabalho não encontrou associações dos haplótipos do *DDAH1* nem do *DDAH2* com alterações na resposta dos pacientes ao sildenafil.

Entre as maiores virtudes do presente estudo, podemos citar a cuidadosa fenotipagem dos pacientes estudados. O presente estudo foi delineado para avaliar se marcadores genéticos podem estar associados à resposta ao sildenafil no tratamento da DE. Sabe-se que a magnitude da resposta ao tratamento com sildenafil pode variar de acordo com a etiologia e comorbidades da DE,¹³⁸ sendo assim os pacientes incluídos no estudo foram divididos em dois grupos: 70 pacientes com DE clínica; e 70 pacientes com DE pós-operatória, conseqüente à prostatectomia radical. Os pacientes com DE clínica compreendem aqueles cuja

doença tenha perfil vasculogênico e que, geralmente, está associada a fatores de risco como doenças cardiovasculares, DM, hipertensão e outros, tendo a disfunção endotelial como denominador comum à DE.^{3; 8} A DE pós-prostatectomia tem, principalmente, origem neurogênica devida à lesão de estruturas neurovasculares que inervam o pênis durante o procedimento cirúrgico.^{136; 137} Em estudos genéticos, é importante separar pacientes com DE de diferentes etiologias, pois um mesmo gene pode exercer diferentes influências dependendo do contexto clínico. Sendo assim, é crítico definir grupos de fenótipo claro e controlar fatores de confusão nestes estudos para reduzir a probabilidade de ignorar ou perder os efeitos genéticos, os quais, muitas vezes, são modestos.¹⁸

Em ambos os grupos, a DE dos pacientes foi diagnosticada por um urologista através de avaliação clínica. Os voluntários tiveram a função erétil avaliada através da pontuação no domínio FE questionário IIEF antes e após o tratamento com sildenafil com uso de uma dose de 50 ou 100 mg sob demanda por, no mínimo, oito vezes. Como já mencionado, o IIEF tem sido adotado como a medida padrão-ouro para a avaliação da eficácia em ensaios clínicos de DE.¹⁴ A fim de medir as respostas ao fármaco foram calculados os valores de Δ IIEF (*score* IIEF pós-tratamento - *score* IIEF pré-tratamento) e Δ IIEF% (percentagem da máxima resposta possível atingida pelo paciente; vide item 4.2) para cada paciente.

Outra virtude de nosso estudo foi o cuidado com as variáveis de confusão que poderiam ter nos levado a associações inexistentes ou que poderiam nos ter impedido de observar os resultados significativos do presente estudo. Conforme descrito na introdução deste trabalho, sabe-se que fatores como idade, tabagismo, consumo de etanol, diabetes e o uso de medicações anti-hipertensivas podem aumentar o risco para a DE e/ou alterar a resposta ao sildenafil.^{11; 21; 22; 115} Portanto,

a fim de corrigir os resultados encontrados por estas variáveis de relevância clínica, foram realizadas análises de regressão linear multivariada e regressão logística multivariada. De forma geral, esses modelos permitiram confirmar os principais achados deste estudo, além de permitirem encontrar um valor de P significativo em algumas análises que estavam com valores de P marginais.

Quanto às limitações do presente trabalho, destaca-se a ausência de estudos de associação genética dos polimorfismos selecionados com o risco para a DE, o que seria de grande valor para discussão deste estudo. Também, não foram examinados outros polimorfismos genéticos relevantes dos genes *DDAH1* e *DDAH2* que possam estar associados à responsividade ao tratamento da DE com sildenafil. Sendo este um estudo de simples associação genética, outra limitação é a impossibilidade de estabelecer uma causalidade para os resultados encontrados. Além disso, estes resultados precisam ser correlacionados com as concentrações plasmáticas de ADMA e de nitrito em ambos os grupos. Ainda, a amostra populacional incluída no presente estudo é relativamente pequena, o que pode ter reduzido o poder estatístico para encontrar associações significativas. Por fim, este trabalho foi realizado na área local da cidade de Ribeirão Preto e, portanto, não reflete as diferentes raças/ populações. Sendo assim, é necessária confirmação das associações encontradas em amostras de diferentes grupos populacionais. Todas as questões apontadas acima devem ser exploradas em estudos futuros. Ademais, os resultados de associação de polimorfismos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* a alterações na resposta ao sildenafil apresentados neste estudo também podem ser verdadeiros para outros inibidores da PDE-5. No entanto, esta possibilidade deve ser testada também.

6.1 Perspectivas futuras

Os resultados obtidos no presente estudo são impactantes e podem ser levados em consideração em três diferentes contextos. O primeiro é relacionado à farmacogenética da DE, pois com o conhecimento prévio dos genótipos de um paciente, pode-se descartar o uso de um fármaco que não será eficaz, evitando frustração e sofrimento psíquico do paciente, assim como o gasto financeiro com a terapia com o sildenafil, que é de alto custo. O segundo contexto refere-se a outras doenças que podem ser tratadas com sildenafil, como a hipertensão pulmonar, cujo desfecho da terapia também pode ser modificado pelos polimorfismos avaliados neste trabalho. Por fim, outras doenças relacionadas a um aumento das concentrações plasmáticas de ADMA e produção reduzida de NO, como DM, hipertensão e doenças cardiovasculares, também podem ser afetadas pelos polimorfismos estudados dos genes *DDAH1* e *DDAH2*.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, concluímos que pacientes com DE decorrente da cirurgia de prostatectomia radical portadores dos alelos variantes A do rs805304 e G do rs805305 (polimorfismos do *DDAH2*) podem ser mais beneficiados pelo tratamento com sildenafil do que portadores dos alelos ancestrais. Concluímos também que o rs1554597, o rs18582 e os haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* parecem não apresentar associações significativas com alterações nas respostas ao fármaco inibidor da PDE-5.

REFERÊNCIAS*

- ¹ Consensus development conference statement. National Institutes of Health. Impotence. December 7-9, 1992. **Int J Impot Res**, v. 5, n. 4, p. 181-284, Dec 1993.
- ² LEWIS, R. W. et al. Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction. **J Sex Med**, v. 7, n. 4 Pt 2, p. 1598-607, Apr 2010.
- ³ SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. **Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 153-65, Jan 12 2013.
- ⁴ JOHANNES, C. B. et al. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **J Urol**, v. 163, n. 2, p. 460-3, Feb 2000.
- ⁵ AYTA, I. A. et al. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **BJU Int**, v. 84, n. 1, p. 50-6, Jul 1999.
- ⁶ DA COSTA GONÇALVES A.C., R. A. B., REIS F.M. Pathophysiology of erectile dysfunction: molecular aspects and clinical implications. **Journal of the Brazilian Society of Hypertension**, v. 10, n. 1, p. 4-10, 2007.
- ⁷ JACKSON, G. Treatment of erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease : guide to drug selection. **Drugs**, v. 64, n. 14, p. 1533-45, 2004.
- ⁸ SOLOMON, H. et al. Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator. **Heart**, v. 89, n. 3, p. 251-3, Mar 2003.
- ⁹ INMAN, B. A. et al. A population-based, longitudinal study of erectile dysfunction and future coronary artery disease. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 2, p. 108-13, Feb 2009.
- ¹⁰ LEE, Y. C. et al. The associations among eNOS G894T gene polymorphism, erectile dysfunction and related risk factors. **BJU Int**, v. 100, n. 5, p. 1116-20, 2007.
- ¹¹ MCVARY, K. T. Clinical practice. Erectile dysfunction. **N Engl J Med**, v. 357, n. 24, p. 2472-81, 2007.
- ¹² GONZALES, A. I. et al. Validation of the International Index of Erectile Function (IIFE) for use in Brazil. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 2, p. 176-82, Aug 2013.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- ¹³ ROSEN, R. C. et al. The international index of erectile function (IIEF): a multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 822-30, Jun 1997.
- ¹⁴ ROSEN, R. C. et al. The International Index of Erectile Function (IIEF): a state-of-the-science review. **Int J Impot Res**, v. 14, n. 4, p. 226-44, Aug 2002.
- ¹⁵ CAPPELLERI, J. C. et al. Diagnostic evaluation of the erectile function domain of the International Index of Erectile Function. **Urology**, v. 54, n. 2, p. 346-51, Aug 1999.
- ¹⁶ BURNETT, A. L. Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. **Int J Impot Res**, v. 16 Suppl 1, p. S15-9, Jun 2004.
- ¹⁷ BURNETT, A. L. et al. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Mol Med**, v. 2, n. 3, p. 288-96, May 1996.
- ¹⁸ LACCHINI, R.; TANUS-SANTOS, J. E. Pharmacogenetics of erectile dysfunction: navigating into uncharted waters. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 11, p. 1519-38, Aug 2014.
- ¹⁹ GINGERICH, S.; KRUKOFF, T. L. Activation of ERbeta increases levels of phosphorylated nNOS and NO production through a Src/PI3K/Akt-dependent pathway in hypothalamic neurons. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 5, p. 878-85, Oct 2008.
- ²⁰ HURT, K. J. et al. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 4061-6, Mar 19 2002.
- ²¹ HUTTER, A. M., JR. Role of the cardiologist: clinical aspects of managing erectile dysfunction. **Clin Cardiol**, v. 27, n. 4 Suppl 1, p. I3-7, Apr 2004.
- ²² CARBONE, D. J., JR.; SEFTEL, A. D. Erectile dysfunction. Diagnosis and treatment in older men. **Geriatrics**, v. 57, n. 9, p. 18-24, Sep 2002.
- ²³ MUSICKI, B.; BURNETT, A. L. eNOS function and dysfunction in the penis. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 2, p. 154-65, Feb 2006.
- ²⁴ LACCHINI, R. et al. Relationship between Arginase 1 and Arginase 2 levels and genetic polymorphisms with erectile dysfunction. **Nitric Oxide**, v. 51, p. 36-42, Dec 1 2015.
- ²⁵ BOURAS, G. et al. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? **Curr Top Med Chem**, v. 13, n. 2, p. 180-200, 2013.
- ²⁶ MASUDA, H. Significance of nitric oxide and its modulation mechanisms by endogenous nitric oxide synthase inhibitors and arginase in the micturition disorders and erectile dysfunction. **Int J Urol**, v. 15, n. 2, p. 128-34, Feb 2008.

- 27 POPE, A. J. et al. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. **Pharmacol Res**, v. 60, n. 6, p. 461-5, Dec 2009.
- 28 KIELSTEIN, J. T. et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. **European journal of clinical investigation**, v. 33, n. 5, p. 370-5, May 2003.
- 29 TOUSOULIS, D. et al. Methionine-induced homocysteinemia impairs endothelial function in hypertensives: the role of asymmetrical dimethylarginine and antioxidant vitamins. **American journal of hypertension**, v. 24, n. 8, p. 936-42, Aug 2011.
- 30 TUTAREL, O. et al. Asymmetrical dimethylarginine--more sensitive than NT-proBNP to diagnose heart failure in adults with congenital heart disease. **PLoS one**, v. 7, n. 3, p. e33795, 2012.
- 31 YANG, L. et al. Asymmetric dimethylarginine concentration and recurrence of atrial tachyarrhythmias after catheter ablation in patients with persistent atrial fibrillation. **J Interv Card Electrophysiol**, v. 32, n. 2, p. 147-54, Nov 2011.
- 32 BOISVERT, F. M. et al. A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. **Mol Cell Proteomics**, v. 2, n. 12, p. 1319-30, Dec 2003.
- 33 TANG, J. et al. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 275, n. 11, p. 7723-30, Mar 17 2000.
- 34 TEERLINK, T. ADMA metabolism and clearance. **Vasc Med**, v. 10 Suppl 1, p. S73-81, Jul 2005.
- 35 ACHAN, V. et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 8, p. 1455-9, Aug 1 2003.
- 36 TEERLINK, T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 851, n. 1-2, p. 21-9, May 15 2007.
- 37 VALLANCE, P.; LEIPER, J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 6, p. 1023-30, Jun 2004.
- 38 NIJVELDT, R. J. et al. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). **Clin Nutr**, v. 22, n. 1, p. 17-22, Feb 2003.

- 39 NIJVELDT, R. J. et al. Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 12, p. 2542-50, Dec 2003.
- 40 DOWSETT, L. et al. Endothelial Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1 Is an Important Regulator of Angiogenesis but Does Not Regulate Vascular Reactivity or Hemodynamic Homeostasis. **Circulation**, v. 131, n. 25, p. 2217-25, Jun 23 2015.
- 41 LEIPER, J. M. et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. **Biochem J**, v. 343 Pt 1, p. 209-14, Oct 1 1999.
- 42 PALM, F. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 6, p. H3227-45, Dec 2007.
- 43 TRAN, C. T. et al. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. **Genomics**, v. 68, n. 1, p. 101-5, Aug 15 2000.
- 44 IMAMURA, M. et al. Alterations of NOS, arginase, and DDAH protein expression in rabbit cavernous tissue after administration of cigarette smoke extract. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 5, p. R2081-9, Nov 2007.
- 45 MASUDA, H. et al. Accumulated endogenous NOS inhibitors, decreased NOS activity, and impaired cavernosal relaxation with ischemia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 6, p. R1730-8, Jun 2002.
- 46 PARK, K. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rat penile tissue: reduced enzyme activity is responsible for erectile dysfunction in a rat model of atherosclerosis. **Int J Impot Res**, v. 21, n. 4, p. 228-34, Jul-Aug 2009.
- 47 HASEGAWA, K. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial growth factor expression through Sp1 transcription factor in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 7, p. 1488-94, Jul 2006.
- 48 LEIPER, J. et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. **Nat Med**, v. 13, n. 2, p. 198-203, Feb 2007.
- 49 LUNEBURG, N. et al. The endothelial ADMA/NO pathway in hypoxia-related chronic respiratory diseases. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 501612, 2014.
- 50 WANG, D. et al. Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. **Circ Res**, v. 101, n. 6, p. 627-35, Sep 14 2007.

- 51 LIND, L. et al. Genetic variation in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 gene (DDAH1) is related to asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, but not to endothelium-dependent vasodilation. **Vasc Med**, v. 18, n. 4, p. 192-9, Aug 2013.
- 52 WADHAM, C.; MANGONI, A. A. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulation: a novel therapeutic target in cardiovascular disease. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 5, n. 3, p. 303-19, Mar 2009.
- 53 ONOZATO, M. L. et al. Expression of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase and protein arginine N-methyltransferase isoforms in diabetic rat kidney: effects of angiotensin II receptor blockers. **Diabetes**, v. 57, n. 1, p. 172-80, Jan 2008.
- 54 WANG, J. et al. L-arginine regulates asymmetric dimethylarginine metabolism by inhibiting dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in hepatic (HepG2) cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 23, p. 2838-46, Dec 2006.
- 55 TRAN, C. T. et al. The DDAH/ADMA/NOS pathway. **Atheroscler Suppl**, v. 4, n. 4, p. 33-40, Dec 2003.
- 56 LEIPER, J. et al. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13527-32, Oct 15 2002.
- 57 JIA, S. J. et al. Lysophosphatidylcholine-induced elevation of asymmetric dimethylarginine level by the NADPH oxidase pathway in endothelial cells. **Vascul Pharmacol**, v. 44, n. 3, p. 143-8, Mar 2006.
- 58 TYAGI, N. et al. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 6, p. H2649-56, Dec 2005.
- 59 AZUMA, H. et al. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. **Br J Pharmacol**, v. 115, n. 6, p. 1001-4, Jul 1995.
- 60 VALLANCE, P. et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **Lancet**, v. 339, n. 8793, p. 572-5, Mar 7 1992.
- 61 BIVALACQUA, T. J. et al. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 283, n. 4, p. 923-7, May 18 2001.
- 62 SURDACKI, A. et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 33, n. 4, p. 652-8, Apr 1999.

- 63 MASUDA, H. et al. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 1, p. 211-8, Jan 1999.
- 64 MIYAZAKI, H. et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. **Circulation**, v. 99, n. 9, p. 1141-6, Mar 9 1999.
- 65 PULLAMSETTI, S. et al. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. **FASEB J**, v. 19, n. 9, p. 1175-7, Jul 2005.
- 66 SAITOH, M. et al. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. **Heart Vessels**, v. 18, n. 4, p. 177-82, Sep 2003.
- 67 ZOCCALI, C. et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. **Lancet**, v. 358, n. 9299, p. 2113-7, Dec 22-29 2001.
- 68 ALTINOVA, A. E. et al. Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 5, p. 1881-5, May 2007.
- 69 SAVVIDOU, M. D. et al. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. **Lancet**, v. 361, n. 9368, p. 1511-7, May 3 2003.
- 70 PARONI, R. et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and L-arginine in patients with arteriogenic and non-arteriogenic erectile dysfunction. **Int J Androl**, v. 35, n. 5, p. 660-7, Oct 2012.
- 71 AZADZOI, K. M. et al. Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. **J Urol**, v. 147, n. 1, p. 220-5, Jan 1992.
- 72 BURNETT, A. L. et al. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 401-3, Jul 17 1992.
- 73 KIM, N. et al. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. **J Clin Invest**, v. 88, n. 1, p. 112-8, Jul 1991.
- 74 SAKAI, Y. et al. Involvement of increased arginase activity in impaired cavernous relaxation with aging in the rabbit. **J Urol**, v. 172, n. 1, p. 369-73, Jul 2004.
- 75 LOYAGA-RENDON, R. Y. et al. Accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity, attenuated dimethylarginine

- dimethylaminohydrolase activity and intimal hyperplasia in premenopausal human uterine arteries. **Atherosclerosis**, v. 178, n. 2, p. 231-9, Feb 2005.
- 76 MACALLISTER, R. J. et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. **Br J Pharmacol**, v. 119, n. 8, p. 1533-40, Dec 1996.
 - 77 WANG, J. H. et al. Effect of DDAH/ADMA/NOS regulation pathway on cavernae corporum cavernosorum rat penis of different age. **Andrologia**, May 25 2015.
 - 78 WIERZBICKI, A. S. et al. Asymmetric dimethyl arginine levels correlate with cardiovascular risk factors in patients with erectile dysfunction. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 421-5, Apr 2006.
 - 79 MAAS, R. et al. Elevation of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and coronary artery disease in men with erectile dysfunction. **Eur Urol**, v. 48, n. 6, p. 1004-11; discussion 1011-2, Dec 2005.
 - 80 DAYOUB, H. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. **Circulation**, v. 108, n. 24, p. 3042-7, Dec 16 2003.
 - 81 HASEGAWA, K. et al. Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2. **Circ Res**, v. 101, n. 2, p. e2-10, Jul 20 2007.
 - 82 JACOBI, J. et al. Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. **Circulation**, v. 111, n. 11, p. 1431-8, Mar 22 2005.
 - 83 KONISHI, H. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase promotes endothelial repair after vascular injury. **J Am Coll Cardiol**, v. 49, n. 10, p. 1099-105, Mar 13 2007.
 - 84 TANAKA, M. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression suppresses graft coronary artery disease. **Circulation**, v. 112, n. 11, p. 1549-56, Sep 13 2005.
 - 85 IANNONE, L. et al. miR-21/DDAH1 pathway regulates pulmonary vascular responses to hypoxia. **Biochem J**, v. 462, n. 1, p. 103-12, Aug 15 2014.
 - 86 CAPLIN, B. et al. Alanine-glyoxylate aminotransferase-2 metabolizes endogenous methylarginines, regulates NO, and controls blood pressure. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 12, p. 2892-900, Dec 2012.
 - 87 LEIPER, J.; NANDI, M. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 4, p. 277-91, Apr 2011.

- 88 ZHOU, J. P. et al. Association of the AGXT2 V140I polymorphism with risk for coronary heart disease in a Chinese population. **J Atheroscler Thromb**, v. 21, n. 10, p. 1022-30, 2014.
- 89 MUNIZ, J. J. et al. Low nitric oxide bioavailability is associated with better responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 386, n. 9, p. 805-11, Sep 2013.
- 90 REID-LOMBARDO, K. M.; PETERSEN, G. M. Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals. **Surgery**, v. 147, n. 4, p. 469-74, Apr 2010.
- 91 CRAWFORD, D. C.; NICKERSON, D. A. Definition and clinical importance of haplotypes. **Annu Rev Med**, v. 56, p. 303-20, 2005.
- 92 JONES, L. C. et al. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 310, n. 3, p. 836-43, Oct 24 2003.
- 93 ABHARY, S. et al. Sequence variation in DDAH1 and DDAH2 genes is strongly and additively associated with serum ADMA concentrations in individuals with type 2 diabetes. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9462, 2010.
- 94 ANDERSSOHN, M. et al. Genetic and environmental determinants of dimethylarginines and association with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. 3, p. 846-54, Mar 2014.
- 95 SEPPALA, I. et al. Genome-wide association study on dimethylarginines reveals novel AGXT2 variants associated with heart rate variability but not with overall mortality. **Eur Heart J**, v. 35, n. 8, p. 524-31, Feb 2014.
- 96 BOGER, R. H. et al. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. **Circulation**, v. 119, n. 12, p. 1592-600, Mar 31 2009.
- 97 KRZYZANOWSKA, K. et al. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1834-9, Jul 2007.
- 98 LU, T. M. et al. Plasma asymmetric dimethylarginine predicts death and major adverse cardiovascular events in individuals referred for coronary angiography. **Int J Cardiol**, v. 153, n. 2, p. 135-40, Dec 1 2011.
- 99 DING, H. et al. A novel loss-of-function DDAH1 promoter polymorphism is associated with increased susceptibility to thrombotic stroke and coronary heart disease. **Circ Res**, v. 106, n. 6, p. 1145-52, Apr 2 2010.
- 100 LUNEBURG, N. et al. Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 7, n. 6, p. 864-72, Dec 2014.

- ¹⁰¹ RHEE, E. P. et al. A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort. **Cell Metab**, v. 18, n. 1, p. 130-43, Jul 02 2013.
- ¹⁰² MAAS, R. et al. Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension. **Pharmacol Res**, v. 60, n. 6, p. 488-93, Dec 2009.
- ¹⁰³ GAD, M. Z. et al. Association of DDAH2 gene polymorphism with cardiovascular disease in Egyptian patients. **J Genet**, v. 90, n. 1, p. 161-3, Apr 2011.
- ¹⁰⁴ PEREZ-HERNANDEZ, N. et al. Protective role of DDAH2 (rs805304) gene polymorphism in patients with myocardial infarction. **Exp Mol Pathol**, v. 97, n. 3, p. 393-8, Dec 2014.
- ¹⁰⁵ MARRA, M. et al. Chronic renal impairment and DDAH2-1151 A/C polymorphism determine ADMA levels in type 2 diabetic subjects. **Nephrol Dial Transplant**, v. 28, n. 4, p. 964-71, Apr 2013.
- ¹⁰⁶ BAI, Y. et al. Common genetic variation in DDAH2 is associated with intracerebral haemorrhage in a Chinese population: a multi-centre case-control study in China. **Clin Sci (Lond)**, v. 117, n. 7, p. 273-9, Oct 2009.
- ¹⁰⁷ O'DWYER, M. J. et al. Septic shock is correlated with asymmetrical dimethyl arginine levels, which may be influenced by a polymorphism in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase II gene: a prospective observational study. **Crit Care**, v. 10, n. 5, p. R139, 2006.
- ¹⁰⁸ WEISS, S. L. et al. Pilot study of the association of the DDAH2 -449G polymorphism with asymmetric dimethylarginine and hemodynamic shock in pediatric sepsis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33355, 2012.
- ¹⁰⁹ XUAN, C. et al. Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 (DDAH 2) Gene Polymorphism, Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) Concentrations, and Risk of Coronary Artery Disease: A Case-Control Study. **Sci Rep**, v. 6, p. 33934, Sep 28 2016.
- ¹¹⁰ ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 3, p. 417-50, Sep 2001.
- ¹¹¹ JEREMY, J. Y. et al. Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus cavernosum in vitro. **Br J Urol**, v. 79, n. 6, p. 958-63, Jun 1997.
- ¹¹² HAKKY, T. S.; JAIN, L. Current use of phosphodiesterase inhibitors in urology. **Turks J Urol**, v. 41, n. 2, p. 88-92, 2015.
- ¹¹³ FERGUSON, J. E., 3RD; CARSON, C. C., 3RD. Phosphodiesterase type 5 inhibitors as a treatment for erectile dysfunction: Current information and new horizons. **Arab J Urol**, v. 11, n. 3, p. 222-9, Sep 2013.

- ¹¹⁴ FREITAS, V. M. et al. Use of phosphodiesterase-5 inhibitors by college students. **Rev Saude Publica**, v. 42, n. 5, p. 965-7, Oct 2008.
- ¹¹⁵ SMITH, W. B., 2ND et al. PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence. **Int J Clin Pract**, v. 67, n. 8, p. 768-80, Aug 2013.
- ¹¹⁶ RENDELL, M. S. et al. Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. Sildenafil Diabetes Study Group. **JAMA**, v. 281, n. 5, p. 421-6, Feb 3 1999.
- ¹¹⁷ HONG, E. K. et al. Time dependent patient satisfaction with sildenafil for erectile dysfunction (ED) after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy (RRP). **Int J Impot Res**, v. 11 Suppl 1, p. S15-22, Sep 1999.
- ¹¹⁸ MUNIZ, J. J. et al. Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. **Pharmacogenomics J**, v. 13, n. 2, p. 189-96, Apr 2013.
- ¹¹⁹ LACCHINI, R. et al. nNOS polymorphisms are associated with responsiveness to sildenafil in clinical and postoperative erectile dysfunction. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 6, p. 775-84, Apr 2014.
- ¹²⁰ LACCHINI, R. et al. VEGF genetic polymorphisms affect the responsiveness to sildenafil in clinical and postoperative erectile dysfunction. **Pharmacogenomics J**, Sep 25 2012.
- ¹²¹ KONYA, H. et al. Asymmetric dimethylarginine, a biomarker of cardiovascular complications in diabetes mellitus. **World J Exp Med**, v. 5, n. 2, p. 110-9, May 20 2015.
- ¹²² AGARWAL, A. et al. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. **J Androl**, v. 27, n. 3, p. 335-47, May-Jun 2006.
- ¹²³ OZKARA, H. et al. Changes of nitric oxide synthase-containing nerve fibers and parameters for oxidative stress after unilateral cavernous nerve resection or manipulation in rat penis. **Chin J Physiol**, v. 49, n. 3, p. 160-6, Jun 30 2006.
- ¹²⁴ MUSICKI, B.; BURNETT, A. L. Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. **Int J Impot Res**, v. 19, n. 2, p. 129-38, Mar-Apr 2007.
- ¹²⁵ BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, Nov 1996.
- ¹²⁶ CELLEK, S. et al. Selective nitroergic neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide-dependent phenomenon. **Br J Pharmacol**, v. 128, n. 8, p. 1804-12, Dec 1999.

- 127 FERRINI, M. et al. Aging-related expression of inducible nitric oxide synthase and markers of tissue damage in the rat penis. **Biol Reprod**, v. 64, n. 3, p. 974-82, Mar 2001.
- 128 ISLAM, B. U. et al. Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). **Indian J Clin Biochem**, v. 30, n. 4, p. 368-85, Oct 2015.
- 129 CASHEN, D. E. et al. Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase. **Br J Pharmacol**, v. 136, n. 5, p. 693-700, Jul 2002.
- 130 NANGLE, M. R. et al. An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. **Pflugers Arch**, v. 448, n. 2, p. 139-45, May 2004.
- 131 OHASHI, Y. et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. **J Clin Invest**, v. 102, n. 12, p. 2061-71, Dec 15 1998.
- 132 TANHAUSEROVA, V. et al. ADMA, SDMA and L-arginine/ADMA ratio but not DDAH genetic polymorphisms are reliable predictors of diabetic nephropathy progression as identified by competing risk analysis. **Kidney Blood Press Res**, v. 36, n. 1, p. 200-8, 2012.
- 133 SEO, H. A. et al. Association of the DDAH2 gene polymorphism with type 2 diabetes and hypertension. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 98, n. 1, p. 125-31, Oct 2012.
- 134 XU, A. G. et al. Association study of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene polymorphisms and coronary heart disease. **Mol Med Rep**, v. 6, n. 5, p. 1103-6, Nov 2012.
- 135 HU, X. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 7, p. 1540-6, Jul 2011.
- 136 AWAD, A. et al. Evolution in the concept of erection anatomy. **Surg Radiol Anat**, v. 33, n. 4, p. 301-12, May 2011.
- 137 CAPOGROSSO, P. et al. Postprostatectomy Erectile Dysfunction: A Review. **World J Mens Health**, v. 34, n. 2, p. 73-88, Aug 2016.
- 138 HATZIMOURATIDIS, K. Sildenafil in the treatment of erectile dysfunction: an overview of the clinical evidence. **Clin Interv Aging**, v. 1, n. 4, p. 403-14, 2006.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Centro Colaborador da OPAS/OMS para o
Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP 14040-902
Fone: 55 16 3315.3382 - 55 16 3315.3381 - Fax: 55 16 3315.0518
www.eerp.usp.br - eerp@usp.br

Ofício CEP-EERP/USP nº 043/2016, de 29.02.2016

Prezado Senhor,

Comunicamos que o projeto de pesquisa, abaixo especificado, foi analisado e considerado **aprovado “ad referendum”** pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP-EERP/USP), em 26 de fevereiro de 2016.

Protocolo CAAE: 51398915.1.0000.5393

Projeto: Efeitos de polimorfismos genéticos em enzimas que metabolizam a dimetilarginina assimétrica sobre a disfunção erétil

Pesquisadores: Ana Maria Milanez Azevedo
Riccardo Lacchini (orientador)

Em atendimento à Resolução 466/12, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Atenciosamente,

Prof.ª Dra. Claudia Benedita dos Santos
Coordenadora do CEP-EERP/USP

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Riccardo Lacchini

Departamento de Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP

ANEXO B – Justificativa do pedido de dispensa do TCLE

Ribeirão Preto, 28 de outubro de 2015.

Justificativa do pedido de dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido.

O estudo das bases genéticas das doenças complexas é de grande importância para o entendimento de diversas doenças complexas como depressão, diabetes, hipertensão arterial, câncer, entre outras. O modelo de estudo transversal, Caso-controle permite que sejam obtidos dados e amostras clínicas dos pacientes que podem responder diversas perguntas de relevância clínica no Brasil. Quando entramos mais especificamente no que tange a fatores genéticos determinando o risco para doenças e a eficácia de seus tratamentos, a comunidade científica estabeleceu já há alguns anos a necessidade de obtenção de grandes amostras (grande número de voluntários), frente a alguns resultados que tem se demonstrado nem sempre consistentes. Isso tem razões estatísticas: é necessário realizar o cálculo de poder amostral e certificar que artigos que reportam ausência de associações tenham pelo menos 80% de poder amostral. Em resumo, isso quer dizer que precisamos de números grandes. Ainda referente à genética, temos algumas características mais comuns, presentes por exemplo em 25 a 50% da população, que ao analisarmos o poder amostral, permitem estudos com n ao redor de 100 casos e 100 controles. O problema é que características genéticas mais raras (frequência entre 5 e 15% na população) precisam de um n de 500 ou mais voluntários por grupo para obter o mesmo poder amostral.

Como obter grandes " n 's? A primeira estratégia é fazer estudos multicêntricos. Esta estratégia envolve grandes custos de execução e limitações técnicas (não são os mesmos pesquisadores coletando da mesma forma as amostras; condições diferentes de armazenamento, transporte, coleta de dados de prontuários, etc). A outra estratégia é realizar coletas a longo prazo em um único centro e armazenar as amostras em um biorrepositório. Esta é a abordagem que escolhemos.

O presente projeto em análise é pequeno e se refere a dissertações, teses, trabalhos de conclusão de curso e/ou projetos de iniciação científica que executem parcial ou

Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde
para o Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP 14040-902
Fone: 55 16 3602.3382 - 55 16 3602.3381 - Fax: 55 16 3602.0519
www.eerp.usp.br - eerp@eerp.usp.br

totalmente um ou mais objetivos de um projeto grande, de longo prazo, em análise pela CEP/EERP/USP.

O projeto em análise se propõe a realizar parte dos objetivos do projeto maior "Bases genéticas da disfunção erétil: da resposta ao stress à produção de óxido nítrico", que foi submetido em paralelo a este projeto, e cuja duração das coletas se dará por dez anos, e cujos números propostos são 500 casos e 500 controles, os quais assinarão um TCLE a ser analisado e aprovado por esta CEP.

No projeto longo os pacientes e voluntários saudáveis são recrutados, assinam o TCLE referente ao projeto longo já aprovado, são feitas coletas de dados através de instrumentos, entrevistas, prospecção de prontuários e coleta de sangue. Os dados são computados em planilha e o material biológico processado e armazenado adequadamente. O projeto menor (mestrado, doutorado, TCC ou IC) em análise se propõe a realizar parte dos experimentos propostos no projeto maior, e simplesmente utilizará dados e amostras que já estarão coletadas em nosso biorrepositório, sem causar ao paciente qualquer novo risco físico ou psicológico, respeitando as limitações dos objetivos já aprovados do projeto maior, respeitando o TCLE original assinado pelo voluntário, e respeitando todos os preceitos no que tange à ética no uso de amostras e dados de seres humanos. Nosso objetivo com isto é evitar que o paciente tenha o aborrecimento de assinar diversos TCLEs referentes a uma mesma pesquisa e facilitar o nosso controle de que a amostra que usamos esteja sem nenhum tipo de pendência ética (por exemplo, ter que pedir para transferir amostras entre diferentes biorepositórios de diferentes projetos de mestrado, ic, doutorado, etc).

Além disso, é necessário que o projeto que vincule as amostras ao biorrepositório seja longo, tenha um TCLE (já submetido junto ao projeto longo) e esteja sob coordenação de docente da EERP/USP para permitir legalmente ao coordenador do projeto que a responsabilidade pelas amostras biológicas fique a cargo única e exclusivamente da EERP/USP. Imagine-se um doutor recém formado pela EERP, passando em um concurso na universidade federal do rio grande do sul, levando embora metade de um biorrepositório da EERP pois é ele o pesquisador principal de sua tese, portanto o responsável pelo

Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde
para o Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP 14040-902
Fone: 55 16 3602.3382 - 55 16 3602.3381 - Fax: 55 16 3602.0519
www.eerp.usp.br - eerp@eerp.usp.br

gerenciamento das amostras sob sua custódia. É uma situação que temos que evitar que sequer seja cogitada.

Finalmente, ressalto que esta situação já foi exposta à Professora Doutora Cláudia Benedita dos Santos, presidente da CEP/EERP/USP, que nos orientou, frente às nossas necessidades, a proceder da forma que estamos fazendo. Em anexo ao presente pedido de aprovação, incluímos o texto do projeto maior, e o TCLE referente à coleta e estocagem das amostras em nosso biorrepositório.

Sem mais, despeço-me com protestos de estima e consideração

Prof. Dr. Riccardo Lacchini

Departamento de Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas

Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

ANEXO C – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE
RIBEIRÃO PRETO - USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Bases genéticas da disfunção erétil: da resposta ao stress à produção de óxido nítrico

Pesquisador: Riccardo Lacchini

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 51408515.9.0000.5393

Instituição Proponente: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.470.518

Apresentação do Projeto:

Trata-se de EMENDA ao Projeto que, originariamente, pretendia investigar as bases genéticas da disfunção erétil, conforme descrito em Parecer anterior deste CEP. Originariamente, eram recrutados 1000 sujeitos, sendo 500 no ambulatório de Urologia do HC de Ribeirão Preto e outros 500, como grupo de Controle, na População de Ribeirão Preto. Pretendia-se coletar amostra de sangue de cada um dos sujeitos para análises genéticas e bioquímicas.

A Emenda, conforme descrito no item 7 da mais recente versão do Projeto, é para que sejam incluídas também amostras PREVIAMENTE COLETADAS de pacientes, originários de outro estudo. Trata-se do Projeto "Farmacogenética do Tratamento de Controles", aprovado pelo CEP do HCFMRP (ofício 2244 do ano de 2008). Tal projeto era de responsabilidade do Prof. Dr. José Tanus do Santos, que então é, neste projeto atual, incluído como colaborador. Naquele Projeto do ano de 2008 houve, como ora mostra o pesquisador, a coleta de amostras entre os anos de 2009 e 2012, também em 500 pacientes e em 500 membros da população, como controle.

A proposta de emenda, portanto, restringe-se ao uso dessas amostras já coletadas, para oferecer "um poder amostral razoável para nos permitir investigar polimorfismos mais raros".

Endereço: BANDEIRANTES 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-902

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-3388

E-mail: cep@eerp.usp.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO - USP

Continuação do Parecer: 1.470.518

Objetivo da Pesquisa:

Seguem os mesmos do projeto anterior: investigar bases genéticas e bioquímicas que predisponham à disfunção erétil.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Seguem os mesmos do parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O proposto na Emenda tem o objetivo de ampliar o aspecto amostral, a partir da comparação com amostras que já foram colhidas. Serão as amostras submetidas aos mesmos parâmetros, salvo a "avaliação psiquiátrica". Portanto, se ampliarão as avaliações bioquímicas e as genéticas sem, em nossa opinião, qualquer sacrifício ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Como documentos novos relevantes ao procedimento ético anexam-se: 1) a autorização de uso das amostras, firmada pelo Pesquisador do Projeto de 2008; e 2) Pedido de dispensa de NOVO TCLE para o aproveitamento das amostras do estudo anterior. Justifica o pedido, basicamente, com a impossibilidade de contatar os sujeitos do projeto de 2008, que já encerraram tratamento ambulatorial.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A justificativa para a dispensa do TCLE é plausível, de modo que, com a autorização do pesquisador do Projeto de 2008, não há impedimento ético para a ampliação do espectro da pesquisa, que certamente aumentará sua eficácia.

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer apreciado "ad referendum".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_676896_E1.pdf	09/03/2016 11:05:45		Aceito
Outros	TCLEdoprojetoantigodaFMRP.doc	09/03/2016 11:05:08	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	EMENDApedidoaocepedispensaTCLE.	09/03/2016	Riccardo Lacchini	Aceito

Endereço: BANDEIRANTES 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-902

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-3386

E-mail: cep@eerp.usp.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO - USP

Continuação do Parecer: 1.470.518

Outros	pdf	11:01:50	Riccardo Lacchini	Aceito
Declaração de Pesquisadores	autorizacaodeusodeamostraspelopesquisador.pdf	09/03/2016 11:00:53	Riccardo Lacchini	Aceito
Declaração de Pesquisadores	pedidoparausodeamostrasaoesquisador.pdf	09/03/2016 10:59:56	Riccardo Lacchini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodisfuncaoerileerp2015v4emendqa.pdf	09/03/2016 10:59:05	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	cartaderespostaaocEP.pdf	04/01/2016 14:43:18	Riccardo Lacchini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLErev2.pdf	04/01/2016 14:41:43	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	autorizacaocoletashcfmrp.pdf	30/11/2015 09:25:13	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	justificativanecessidadeutilizacaoafutura.pdf	29/11/2015 08:56:54	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	declsubmissaoestudosfuturos.pdf	29/11/2015 08:55:50	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	ORcAMENTO2.pdf	29/11/2015 08:53:58	Riccardo Lacchini	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoprgrandeassinada.pdf	23/11/2015 11:18:47	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	percepcaostress.pdf	29/10/2015 16:51:02	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	IEEF.doc	29/10/2015 16:49:48	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	YlmarCorreaNetoAnexoll.pdf	29/10/2015 16:41:31	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	SaudeMentaltracking0703.pdf	29/10/2015 16:41:10	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	EscalaBECKdeIdeacaoSuicida.pdf	29/10/2015 16:40:43	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	EscalaBECKdeDesesperanca.pdf	29/10/2015 16:39:20	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	entrevistaSCID.pdf	29/10/2015 16:37:28	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	ChildhoodTraumaQuestionnaire.docx	29/10/2015 16:37:16	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	Beckdepressao.doc	29/10/2015 16:37:04	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	BEckansiedade.doc	29/10/2015 16:36:51	Riccardo Lacchini	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAv1.pdf	29/10/2015 16:34:03	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	EncaminhamentoCEPRiccardo.pdf	29/10/2015	Riccardo Lacchini	Aceito

Endereço: BANDEIRANTES 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-902

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-3386

E-mail: cep@eerp.usp.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE
RIBEIRÃO PRETO - USP

Continuação do Parecer: 1.470.518

Outros	EncaminhamentoCEPRiccardo.pdf	16:29:58	Riccardo Lacchini	Aceito
--------	-------------------------------	----------	-------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 30 de Março de 2016

Assinado por:

Claudia Benedita dos Santos
(Coordenador)

Endereço: BANDEIRANTES 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-902

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-3386

E-mail: cep@eerp.usp.br

ANEXO D – Índice Internacional de Função Erétil (IIEF)

	Número _____
Projeto “Bases Genéticas da disfunção erétil: Da resposta ao Stress à Produção de Oxido Nítrico” Índice Internacional de Função Erétil (IIEF)	
Número do Prontuário HC: _____ Data: _____	
Estado Civil/Parceira fixa: _____	
Uso de fármaco estimulante da ereção (tipo/resposta): _____	
Resposta ao caverjet: _____	
Score IIEF: Pré-prostatectomia _____ Pós-prostatectomia _____ Pré-sildenafil _____ Pós-sildenafil _____	
1. Nas últimas quatro semanas, com que frequência você foi capaz de ter uma ereção durante uma relação sexual?	☐ Sem atividade sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
2. Nas últimas quatro semanas, quando você teve ereções sexuais com estimulação, com que frequência foram suas ereções, duras o suficiente para penetração?	☐ Sem estimulação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
3. Nas últimas quatro semanas, quando você tentou ter relação sexual com que frequência foi capaz de penetrar (entrar) na sua parceira?	☐ Não tentei ter relação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
4. Nas últimas quatro semanas, durante uma relação sexual com que frequência você foi capaz de manter sua ereção após ter penetrado (entrado) na sua parceira?	☐ Não tentei ter relação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
5. Nas últimas quatro semanas, durante uma relação sexual, o quanto foi difícil para você manter sua ereção até o fim da relação?	☐ Não tentei ter relação sexual ☐ Extremamente difícil ☐ Muito difícil ☐ Difícil ☐ Pouco difícil ☐ Não difícil
6. Nas últimas quatro semanas, quantas vezes você tentou ter relação sexual?	☐ Não tentou ☐ 1-2 tentativas ☐ 3-4 tentativas ☐ 5-6 tentativas ☐ 7-10 tentativas ☐ 11 ou mais tentativas
7. Nas últimas quatro semanas, quando você tentou ter relação sexual com que frequência ela foi satisfatória para você?	☐ Não tentei ter relação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca

8. Nas últimas quatro semanas, o quanto você aproveitou a relação sexual?	☐ Não teve relação sexual ☐ Aproveitou extremamente ☐ Aproveitou muito ☐ Aproveitou um tanto ☐ Aproveitou muito pouco ☐ Não aproveitou
9. Nas últimas quatro semanas, quando você teve estimulação sexual ou relação sexual com qual frequência você teve uma ejaculação?	☐ Não teve estimulação sexual ou relação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
10. Nas últimas quatro semanas, quando você teve estimulação sexual ou relação sexual com que frequência você teve a sensação de orgasmo com ou sem ejaculação?	☐ Não teve estimulação sexual ou relação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
11. Nas últimas quatro semanas, com que frequência você tem sentido desejo sexual?	☐ Quase sempre ou sempre ☐ Frequentemente (muito mais que a metade do tempo) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade do tempo) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade do tempo) ☐ Quase nunca ou nunca
12. Nas últimas quatro semanas, o quanto você consideraria o seu nível de desejo sexual?	☐ Muito alto ☐ Alto ☐ Moderado ☐ Baixo ☐ Muito baixo ou inexistente
13. Nas últimas quatro semanas, de modo geral, o quão satisfeito você tem estado com sua vida sexual?	☐ Muito satisfeito ☐ Moderadamente satisfeito ☐ Igualmente satisfeito e insatisfeito ☐ Moderadamente insatisfeito ☐ Muito insatisfeito
14. Nas últimas quatro semanas, de modo geral, o quão satisfeito você tem estado com o seu relacionamento sexual com a sua parceira?	☐ Muito satisfeito ☐ Moderadamente satisfeito ☐ Igualmente satisfeito e insatisfeito ☐ Moderadamente insatisfeito ☐ Muito insatisfeito
15. Nas últimas quatro semanas, como você consideraria a sua confiança em conseguir ter e manter uma ereção?	☐ Muito alta ☐ Alta ☐ Moderada ☐ Baixa ☐ Muito baixa

Contato: Laboratório de Farmacogenética EERP
 Telefone 3315 3447 ou 3315 9157
 Responsáveis: Guilherme e Ana Maria