UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM PSIQUIÁTRICA E CIÊNCIAS HUMANAS

ANDERSON HEIJI LIMA MIYAZAKI

Polimorfismos genéticos da Alanina—Glioxilato Aminotransferase 2 (AGXT2) associados à disfunção erétil e marcadores de resposta aos iPDE-5

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM PSIQUIÁTRICA E CIÊNCIAS HUMANAS

ANDERSON HEIJI LIMA MIYAZAKI

Polimorfismos genéticos da Alanina—Glioxilato Aminotransferase 2 (AGXT2) associados à disfunção erétil e marcadores de resposta aos iPDE-5

Ribeirão Preto

2019

ANDERSON HEIJI LIMA MIYAZAKI

Polimorfismos genéticos da Alanina—Glioxilato Aminotransferase 2 (AGXT2) associados à disfunção erétil e marcadores de resposta aos iPDE-5

VERSÃO ORIGINAL

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Linha de pesquisa: Farmacogenética

Orientador: Prof. Dr. Riccardo Lacchini

Ribeirão Preto

2019

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

Miyazaki, Anderson Heiji Lima
Polimorfismos genéticos da Alanine—Glioxylate Aminotransferase 2 (AGXT2) relacionados à disfunção erétil e marcadores de resposta aos iPDE-5. . Ribeirão Preto, 2019.
155 p. : il. ; 30 cm
Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Psiquiátrica.
Orientador: Riccardo Lacchini

1. Disfunção Erétil. 2. SDMA. 3.Óxido Nítrico. 4.Polimorfismos genéticos

MIYAZAKI, Anderson Heiji Lima

Polimorfismos genéticos da Alanine—Glioxylate Aminotransferase 2 (AGXT2) relacionados à disfunção erétil e marcadores de resposta aos iPDE-5.

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Psiquiátrica.

Aprovado em / /

Presidente

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Dedico este trabalho aos meus pais Élio e Ivonete. Grandes incentivadores da educação e pessoas incríveis, que sempre me apoiaram e me deram suporte.

AGRADECIMENTOS

À minha família Élio, Ivonete, Fernando, Beatriz, Thaís e Bartô pelo apoio, carinho e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família de Ribeirão Preto Letícia Dionízio, Mariana Mendes, Kathrein Sena, Keila Daniel e Toddy Henrique, que sempre estiveram comigo, me apoiando e dando suporte presencial.

Ao PGXlab, em especial ao Prof. Dr. Riccardo Lacchini, pela orientação, paciência e disseminação de seu amplo conhecimento e aos meus amigos de laboratório Fernanda Dornelas, Letícia Ferezin, Sherliane Pereira, Ana Azevedo, Cezar Kayzuka e Vitória Rondon, que são cientistas incríveis e me ajudaram muito no desenvolvimento deste.

Aos meus grandes amigos do "Grupo" Brisa Luisa, Carolina Gomes, Mariana Mendes Michel Marcossi, Tamily Siqueira, Nathalia Brandani, Raissa Bedon, Jeovana Turatti, Mayara Debone e Aiesha Veloso, que mesmo estando separados, estamos sempre juntos, sendo fonte de apoio uns dos outros.

Ao Grupo PET, que sempre me deu apoio, estiveram comigo, foram e ainda são parte da minha vida acadêmica. Pessoas de grande valor ao qual possuo grande carinho.

Ao André Gonçalves, que me ouviu, me apoiou e me aconselhou em muitos momentos durante a realização deste trabalho. Um ser humano incrível!

À todos os meus amigos, que de alguma forma participaram dessa fase. Todos, sem exceção, foram extremamente importantes. Estarão sempre na minha vida!

À todos acima citados, MINHA ETERNA GRATIDÃO!

“To see a world in a grain of sand
And a heaven in a wild flower,
Hold infinity in the palm of your hand
And eternity in an hour.”

William Blake

RESUMO

MIYAZAKI, A. H. L. **Polimorfismos genéticos da Alanina—Glioxilato Aminotransferase 2 (AGXT2) associados à disfunção erétil e marcadores de resposta aos iPDE-5** 2019 155 f Dissertação (Mestrado em Enfermagem Psiquiátrica) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Disfunção Erétil (DE) é caracterizada pela incapacidade de obter ou manter uma ereção suficiente para que ocorra atividade sexual satisfatória. Uma das principais características da DE está relacionada ao possível déficit na produção de Óxido Nítrico (NO) no corpo humano. O NO é produzido através da L-arginina, via Óxido Nítrico Sintase neuronal, endotelial e induzível (nNOS, eNOS e iNOS). As dimetilargininas assimétrica (ADMA) e a simétrica (SDMA) são formas metiladas da L-arginina e atuam como agentes inibidores das NOS, portanto os níveis aumentados de ADMA e SDMA estão associados a menor produção de NO. Uma das principais enzimas responsáveis pela degradação de ADMA e SDMA é a AGXT2, codificada pelo gene homônimo. Estudos têm relacionado polimorfismos genéticos da *AGXT2* a doenças cardiovasculares e todo o contexto do NO, podendo ser utilizados como marcadores para o risco de desenvolvimento de DE. Os objetivos deste estudo visam relacionar polimorfismos genéticos da *AGXT2* (rs37369 e rs16899974) ao risco para desenvolvimento de DE e ao resultado da terapia medicamentosa com inibidores da fosfodiesterase 5 (iPDE-5). Trata-se de um estudo de dois braços, sendo o primeiro um estudo caso-controle e outro apenas com os pacientes em uso de iPDE-5, avaliando a resposta a essa classe de fármacos. A função erétil dos voluntários desta pesquisa foi avaliada através da escala Índice Internacional de Função Erétil (IIEF). Os genótipos foram obtidos por PCR em tempo real. Foram encontrados associações significativas entre os marcadores genéticos e a resposta ao sildenafil e aos níveis de nitrito e ADMA. Quanto ao estudo caso-controle não foram encontrados associações significativas para este estudo.

Palavras-Chave: Disfunção Erétil. SDMA. Óxido Nítrico. Polimorfismos genéticos

ABSTRACT

MIYAZAKI, A. H. L. **Genetic polymorphysms of alanine – Glyoxylate Aminotransferase 2 (AGXT2) associated with erectile dysfunction and response markers to iPDE-5** 2019 155 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem Psiquiátrica) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

Erectile Dysfunction (ED) is characterized by the inability to obtain or maintain an erection sufficient for satisfactory sexual activity to occur. One of the main features of ED is related to the possible deficit in the production of nitric oxide (NO) in the human body. NO is produced through L-arginine via neuronal, endothelial and inducible nitric oxide synthase (nNOS, eNOS and iNOS). Asymmetric (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginines are methylated forms of L-arginine and act as NOS inhibitory agents, so increased levels of ADMA and SDMA are associated with decreased NO production. One of the main enzymes responsible for the degradation of ADMA and SDMA is AGXT2, encoded by the homonymous gene. Studies have linked genetic polymorphisms of AGXT2 to cardiovascular diseases and the entire context of NO, and can be used as markers for the risk of developing ED. The objectives of this study were to correlate AGXT2 genetic polymorphisms (rs37369 and rs16899974) with the risk for developing ED and the outcome of the drug therapy with phosphodiesterase 5 inhibitors (iPDE-5). It is a two-arm study, the first being a case-control study and the other only with patients using iPDE-5, evaluating the response to this class of drugs. The erectile function of the volunteers of this research was evaluated through the International Index of Erectile Function (IIEF) scale. Genotypes were obtained by real-time PCR. Significant associations were found between genetic markers and response to sildenafil and levels of nitrite and ADMA. Regarding the case-control study, no significant associations were found for this study.

Keywords: Erectile Dysfunction. SDMA. Nitric Oxide. Genetic Polymorphisms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema estrutural de corte seccional do pênis humano..... 26

Figura 2 – Arginina e suas formas metiladas 31

Figura 3 – *Score* FE *vs* genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Pacientes 56

Figura 4 – *Score* FE *vs* haplótipos do gene *AGXT2* - grupo Pacientes 56

Figura 5– ADMA *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo Controles... 59

Figura 6 – ADMA *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo Pacientes... 60

Figura 7 – ADMA *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo Controles..... 62

Figura 8 – ADMA *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo Pacientes..... 62

Figura 9 – Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo Controles... 64

Figura 10 – Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo Pacientes.. 64

Figura 11 – Nitrito *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo Controles..... 66

Figura 12 – Nitrito *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo Pacientes..... 66

Figura 13 –Associação dos genótipos dos polimorfismos estudados com os três parâmetros da resposta ao Sildenafil – grupo DEPP..... 75

Figura 14 –Associação dos genótipos dos polimorfismos estudados com os três parâmetros da resposta ao Sildenafil – grupo DEC..... 76

Figura 15 –Associação dos Haplótipos dos polimorfismos estudados com os três parâmetros da resposta ao Sildenafil – grupo DEPP..... 80

Figura 16 –Associação dos Haplótipos dos polimorfismos estudados com os três parâmetros da resposta ao Sildenafil – grupo DEC..... 81

Figura 17 – ADMA *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo DEPP 84

Figura 18 – ADMA *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo DEC 86

Figura 19 – ADMA *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo DEPP 88

Figura 20 – ADMA *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo DEC 90

Figura 21 – Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo DEPP 93

Figura 22 – Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo DEC 96

Figura 23 – Nitrito *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo DEPP 98

Figura 24 – Nitrito *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo DEC 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do grau de DE segundo a pontuação no domínio função erétil do questionário IIEF 25

Tabela 2: Evidências clínicas e funcionais de polimorfismos do gene *AGXT2*..... 34

Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados..... 53

Tabela 4 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre os grupos Controles e Pacientes 54

Tabela 5 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *AGXT2* entre os grupos Controles e Pacientes..... 55

Tabela 6 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de *score* FE no grupo Pacientes 57

Tabela 7 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de *score* FE no grupo Pacientes 58

Tabela 8 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de ADMA nos grupos Controles e Pacientes 61

Tabela 9 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de ADMA nos grupos Controles e Pacientes 63

Tabela 10 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de Nitrito nos grupos Controles e Pacientes 65

Tabela 11 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de Nitrito nos grupos Controles e Pacientes 67

Tabela 12 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados..... 69

Tabela 13 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre os grupos Bons Respondedores (BR) e Maus Respondedores (MR) – grupo DEPP..... 71

Tabela 14 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre os grupos Bons Respondedores (BR) e Maus Respondedores (MR) – grupo DEC..... 72

Tabela 15 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *AGXT2* entre os grupos Bons Respondedores (BR) e Maus Respondedores (MR) – grupo DEPP..... 73

Tabela 16 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *AGXT2* entre os grupos Bons Respondedores (BR) e Maus Respondedores (MR) – grupo DEC..... 74

Tabela 17 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de ΔIIEF, ΔIIEF% e IIEF pós-tratamento no grupo DEPP resposta..... 77

Tabela 18 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de ΔIIEF, ΔIIEF% e IIEF pós-tratamento no grupo DEC resposta 78

Tabela 19 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos Haplótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de ΔIIEF, ΔIIEF% e IIEF pós-tratamento no grupo DEPP resposta 82

Tabela 20 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos Haplótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de ΔIIEF, ΔIIEF% e IIEF pós-tratamento no grupo DEC resposta 83

Tabela 21 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de ADMA no grupo DEPP 85

Tabela 22 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de ADMA no grupo DEC resposta 87

Tabela 23 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de ADMA no grupo DEPP . 89

Tabela 24 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de ADMA no grupo DEC ... 91

Tabela 25 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de nitrito no grupo DEPP resposta 94

Tabela 26 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de nitrito no grupo DEC 97

Tabela 27 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de nitrito no grupo DEPP... 99

Tabela 28 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de nitrito no grupo DEC... 101

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA – dimetilarginina assimétrica

AGXT2 – Alanina—Glioxilato Aminotransferase 2

BAIB - β-aminoisobutirato

DCV – doenças cardiovasculares

DDAH – enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolase

DE – disfunção erétil

DEC – disfunção erétil clínica

DEPP – disfunção erétil pós prostatectomia

DM – Diabetes mellitus

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etileno diamino tetra acético

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*

iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzível

iPDE-5 – inibidores da fosfodiesterase tipo 5

LD – *Linkage Disequilibrium*

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MAF – *minor allele frequency*

MRP – máximo respondedor possível

NANC – fibras não-adrenérgicas não-colinérgicas

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO – óxido nítrico

NOS – enzima óxido nítrico sintase

nNOS – enzima óxido nítrico sintase neuronal

OR – *odds ratio*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PRMTs – *protein arginine methyltransferases*

***score* FE** – pontuação no domínio função erétil do IIEF

SDMA – dimetilarginina simétrica

SNP – *single nucleotide polymorphism*

Teste χ^2 – teste do qui-quadrado

VNTR - *Variable Number of Tandem Repeats*

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

ΔIIEF% – percentagem da máxima resposta possível atingida pelo paciente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 22
1.1. Definição e dados epidemiológicos sobre Disfunção Erétil 22
1.2. Fisiologia da função erétil 26
1.3. Fisiopatologa da disfunção erétil e sua ligação com DCV 28
1.4. A enzima Alanina-Glioxilato Aminotransferase2 (AGXT2) 31
1.5. Polimorfismos genéticos e AGXT2 32
1.6. Tratamento da disfunção erétil 35
2. HIPÓTESE 39
3. OBJETIVO 41
3.1. Objetivo Geral 41
3.2. Objetivos específicos 41
4. MATERIAIS E MÉTODOS 43
4.1. Seleção de participantes 43
4.2. Avaliação da função erétil e da resposta ao tratamento com sildenafil 45
4.3. Dados bioquímicos 45
4.4. Nitrito 45
4.5. Extração de DNA genômico 46
4.6. Genotipagens 47
4.7. Estimativa de Haplótipos 48
4.8. Análises Estatísticas 48
5. RESULTADOS 50
6. DISCUSSÃO 103
6.1. Polimorfismos e o IIEF 105
6.2. Polimorfismos e níveis plasmáticos de ADMA 107

6.3. Polimorfismos e níveis plasmáticos de nitrito (marcador do óxido nítrico) 109

6.4. Limitações e fortalezas do estudo 112

7. CONCLUSÃO 115

8. REFERÊNCIAS 116

9. ANEXOS 132

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição e dados epidemiológicos sobre Disfunção Erétil.

Disfunções sexuais, segundo o DSM V (2013), se caracterizam por perturbações clinicamente significativas na capacidade de uma pessoa de responder, iniciar ou experimentar algum tipo de atividade sexual. Estas perturbações devem ser persistentes por pelo menos seis meses. Entre estas perturbações, destaca-se a Disfunção Erétil (DE)[1]. Uma definição mais próxima do contexto de urologia é que Disfunção Erétil (DE) é caracterizada pela incapacidade de obter e manter uma ereção suficiente para que haja uma atividade sexual satisfatória[2]. A DE não é considerada como uma doença, mas sim como um problema de saúde, decorrente de outras etiologias, como disfunções cardiovasculares, doenças psicológicas, sedentarismo, tabagismo, e etilismo[3].

Estima-se que cerca de metade dos homens com mais de 40 anos possuam algum grau de DE, seja ela leve, moderada ou grave[4]. O grau de DE, bem como sua maior incidência, são diretamente proporcionais à idade, portanto, quanto maior a idade, maiores as chances de possuir algum grau mais grave de DE, podendo variar de 50% a 100% em homens com mais de 70 anos, sendo considerada um fator de risco importante para o desenvolvimento da condição. [4; 5; 6; 7]. Realizar estudos sobre incidência e prevalência da DE tem sido um desafio, pois, por não se tratar de uma doença específica e muitos dos que possuem, não procuram ajuda de um profissional. Além disso, assuntos envolvendo a sexualidade ainda são considerados um tabu na sociedade, ocasionando desta forma, um possível número subestimado de casos reais de DE [8]. Apesar dessa dificuldade, alguns estudos mostram a incidência de DE em diversas populações. Um dos mais importantes é o *"The Massachussets Male Aging Study (MMAS)"*[9], um estudo longitudinal iniciado em 1987, com cerca de 1700 homens de 40 a 70 anos, mostrando que cerca de 52% dos participantes possuíam algum grau de DE. Mais recentemente, Quilter et al. (2017),

mostrou em um estudo com 2000 homens entre 40 e 70 anos, na Nova Zelândia, uma prevalência de 42% de homens com algum grau de DE [10]. Um estudo brasileiro conduzido por Abdo et al. (2006), confirma a tendência mundial, de prevalência de DE, em aproximadamente 50% dos 2682 homens estudados, com idade a partir dos 18 anos[5].

A previsão para o ano de 2025 é de que cerca de 322 milhões de homens terão algum grau de DE. Países em desenvolvimento, como os da África e América Latina poderão ser os mais afetados[11].

A DE pode ser classificada de acordo com sua etiologia principal, sendo divida em: DE orgânica, DE psicogênica e DE mista. A DE do tipo orgânica representa a maioria dos casos e entram nesta classificação causas como endócrinas, vasculares, neurológicas ou induzidas via uso de fármacos. Entre todas estas, a DE causada por doenças vasculares representa cerca de 70% dos casos [12; 13].

Alguns estudos têm relacionado a DE como marcador para doenças cardiovasculares (DCV), como doença arterial coronariana e infarto agudo do miocárdio. Estes estudos têm, por exemplo, relacionado o aumento de casos de infarto agudo do miocárdio em homens que apresentaram algum grau de DE [12; 14]. Além do mais, existem diversos fatores de risco em comum, relacionados tanto com a DE quanto a alguma doença cardiovascular. Podem ser citados, por exemplo, diabetes mellitus, hipertensão, hipercolesterolemia, e tabagismo [15].

A DE de causa psicogênica tem sido pouco estudada ao longo dos anos. Alguns estudos mostram a influência da ansiedade, depressão, imagem corporal, interesse sexual diminuído, entre outros fatores, considerados psicogênicos, influenciando na função sexual do homem [9; 16]. A ansiedade pode interferir na função erétil de variadas formas, pois pode diminuir, por exemplo, a atenção e o foco durante o intercurso sexual[17]. Pode

também atuar no sistema parassimpático, diminuindo seu funcionamento ou inibindo sua ativação, ou também, atuar aumentando o funcionamento do sistema nervoso simpático, fatos que podem impactar a ereção e a atividade sexual [17]. Um histórico prévio de DE, mesmo depois de tratado, pode também causar ansiedade no homem[18]. Relata-se que uma vez que houve algum episódio de DE, gera-se ansiedade e medo, e estes reforçam a DE, tornando-se um ciclo vicioso [18; 19].

Depressão e DE possuem sintomas das mais variadas etiologias, sejam elas orgânicas ou não orgânicas. Sintomas característicos da depressão, como perda de interesse pelas atividades diárias, falta de energia, perda de prazer, entre outros, podem ser indicativos e preditores para o desenvolvimento do quadro de DE [20].

Portanto é importante definir fatores de vulnerabilidade que possam causar DE, facilitando sua prevenção e tratamento, em última análise reduzindo as chances deste homem de desenvolver ou de piora de quadro de algum tipo de doença psiquiátrica associada.

Existem diferentes formas de quantificar e qualificar a ereção. Pode-se destacar, por exemplo, a Tumescência Peniana Noturna, que consiste em avaliação da ereção durante o sono REM, esta é uma técnica bastante efetiva para diferenciação entre DE orgânica e DE psicogênica, pois, caso haja ereção noturna, há maior possibilidade de que o homem possua DE psicogênica[21]. Outro método conhecido para avaliação é o Doppler peniano, que consiste em avaliação pré e pós injeção intracarvenosa de drogas vasoativas[21]. E algumas outras técnicas, como alguns testes neurológicos, cavernosometria e arteriografia pudenda seletiva[22; 23].

Com a finalidade de classificar o grau de disfunção erétil, foi criado e validado o International Index of Erectile Function (IIEF), um questionário composto de 15 itens,

divididos em 5 domínios (função erétil, função orgástica, desejo sexual, satisfação no intercurso e satisfação geral). Este questionário autoaplicável e foi desenvolvido para estimar medidas de função erétil em um homem que possui vida sexual ativa. A pontuação final é dada pela soma das pontuações de cada domínio (com valores variáveis). Quando a pontuação do homem neste questionário é mais baixa, indica baixa qualidade de na vida sexual do mesmo [24]. Hoje, o IIEF é considerado como a mais utilizada medida de avaliação de função erétil masculina, tanto no contexto clínico, como no contexto de pesquisa, já que este é um questionário que pode ser utilizado pelos mais variados profissionais de saúde [24].

À partir do domínio Função Erétil do IIEF, classificou-se a DE em cinco categorias diferentes, com pontuação de 06 a 30, conforme mostrado na tabela abaixo [25; 26].

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

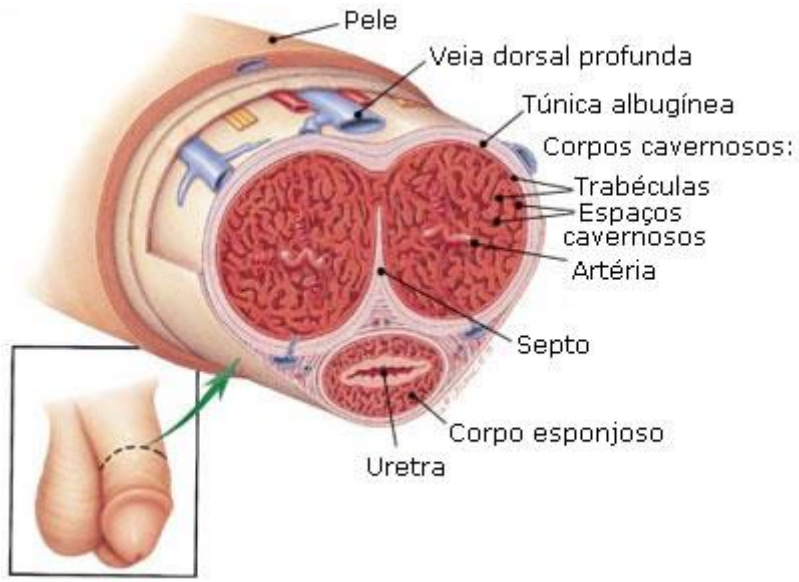
DE: disfunção erétil; IIEF: índice internacional de função erétil.

Adaptado de Gonzáles et al. (2013).

1.2. Fisiologia da função erétil

A estrutura do pênis tem sido alvo de estudos há milhares de anos. Existem evidências documentais de que as primeiras descrições da estrutura peniana se deram em 2000 A.C., em papiros egípcios[27]. A composição estrutural do pênis se baseia em três estruturas cilíndricas, formadas por dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso, que envolve a uretra e ainda forma a glande na porção distal do pênis [27]. De modo geral, os tecidos eréteis possuem como suporte, a túnica albugínea, ligamentos e músculos [28].

Figura 1: Esquema estrutural de corte seccional do pênis humano.



Fonte: Histologia Básica – Luiz C. Junqueira e José Carneiro. Editora Guanabara Koogan S.A. (10° Ed), 2004

A túnica albugínea é uma estrutura que envolve os corpos cavernosos. Ela mantém e dá estrutura, fornecendo suporte essencial para todo o tecido erétil. A Túnica é formada, em sua maior parte, por colágeno e fibras elásticas e é um tecido flexível, o que confere uma característica de “adaptabilidade” ao pênis em seu estado flácido. Por outro lado, quando em ereção, a túnica delimita até onde o intumescimento pode ocorrer, mantendo a força e rigidez durante a ereção [28].

O processo se inicia via estímulo sensorial (visual, olfativo, tátil, auditivo, “imaginativo”) gerando respostas a nível fisiológico e psicológico e consequente obtenção e sustentação da ereção [12].

Para que a ereção peniana ocorra, diversas ações ocorrem de maneira simultânea, por exemplo, aumento do fluxo sanguíneo arterial para dentro dos corpos cavernosos, diminuição do fluxo sanguíneo venoso para fora dos corpos cavernosos, liberação de agentes vasodilatadores, relaxamento das células musculares lisas dos corpos cavernosos, entre outros [29].

Entre todos os fatores fisiológicos citados, podemos dar um maior destaque para a atuação do Oxido Nítrico (NO). O NO atua como neurotransmissor em nervos que inervam a parede vascular e em órgãos efetores, por exemplo, músculo liso no trato vascular, no trato urinário, no trato respiratório, entre outros [30; 31]. O NO é produzido via L-arginina por uma enzima chamada NO sintase, a qual possui três isoformas diferentes, chamadas de endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) [32].

Alguns estudos pioneiros em relação à função erétil realizados tanto em seres humanos como em animais revelaram as verdadeiras funcionalidades do NO [30; 33; 34; 35; 36]. A estimulação via sentidos, como supracitado, sinaliza para as fibras Não-Adrenérgicas-Não-Colinérgicas (NANC), que por sua vez, são responsáveis pela liberação do NO nos corpos cavernosos do pênis utilizando a enzina nNOS. Na célula muscular lisa, o NO é responsável pela ativação da guanilato ciclase solúvel e por conseguinte, sendo capaz de aumentar os níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) [37]. Seguindo o processo, ocorre o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso e vasodilatação de arteríolas aferentes [38]. Com a vasodilatação, o aumento do fluxo sanguíneo nestas arteríolas aumenta de forma bastante importante, causando uma maior força e pressão de atrito do

sangue contra a parede. Este é chamado de estresse de cisalhamento, o que induz uma maior produção de NO, vinda do endotélio, pela enzima eNOS [39]. Assim, ocorre o início da ereção efetivamente. Para dar continuidade ao processo de ereção, a cadeia venosa eferente é pressionada contra a túnica albugínea, ocasionando em uma obstrução do sangue dentro do corpo cavernoso, mantendo-o ereto [40]. Os níveis de NO são mantidos durante este processo devido à fosforilação de ambas as NO sintases (nNOS e eNOS), portanto, mantendo a produção do NO, mesmo não havendo a estimulação sensorial inicial propriamente dita [39].

Para finalizar o processo de ereção e para que pênis retorne novamente ao estado flácido, chamado de detumescência do pênis, é ativada uma enzima Fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5) [41]. Esta é responsável pela degradação do GMPc, um dos responsáveis pelo processo de ereção. Vale ressaltar que não somente a PDE-5 é responsável por este processo de detumescência, mas também, a ação de Noradrenalina (NA) e Angiotensina II (Ang II) nos corpos cavernosos, também é responsável direta pela detumescência do pênis [42; 43].

1.3. Fisiopatologa da disfunção erétil e sua ligação com DCV.

Como mencionado anteriormente, há uma clara ligação entre o surgimento das doenças cardiovasculares (DCV) e da disfunção erétil (DE)[44]. Alguns estudos, que utilizaram, por exemplo, como base o IIEF para a avaliação da função erétil em homens hipertensos, demonstraram que a prevalência de DE em pacientes que possuem tal condição pode chegar a 69%, um número maior do que na média geral da população [45].

Portanto, fatores fisiológicos já associados à hipertensão podem compartilhar vias fisiopatológicas com a disfunção erétil. Como mencionado anteriormente, o óxido nítrico tem um papel fundamental no processo de ereção. Estudos associaram a Hipertensão

Arterial Sistêmica (HAS) à diminuição da produção de NO, substância essencial para vasodilatação e manutenção dos níveis pressóricos normais [46; 47].

Alguns dos fatores que estão associados a menor biodisponibilidade do NO, são a disponibilidade endógena de L-arginina (que é o substrato para produção de NO, via ação das NOS [48; 49]), sequestro do NO por stress oxidativo, alterações funcionais no gene *NOS3* [50] e competição das formas metiladas da L-arginina com a L-arginina pela mesma enzima[51].

A dimetilarginina assimétrica (ADMA), dimetilarginina simétrica (SDMA) e Monometilarginina simétrica (L-NMMA) são formas metiladas da L-arginina e agem reduzindo a atividade dos três tipos de NOS (nNOS, eNOS e iNOS) [52].

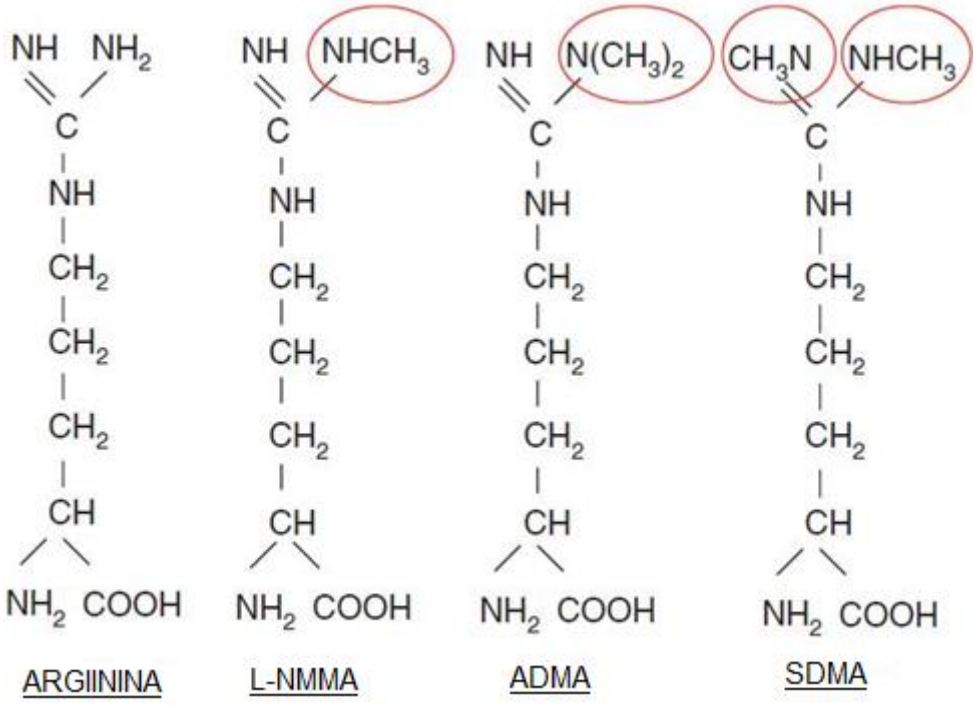
Diversos estudos têm associado a ADMA a doenças cardiovasculares, pressão arterial, resistência à insulina, espessura da camada íntima-média da carótida e como biomarcador de aterosclerose [53; 54; 55; 56]. Em situações patológicas de aumento de ADMA, estima-se que a produção de NO pode ser diminuída entre 30 e 70%, à depender da gravidade do caso em questão [57].

A SDMA, diferentemente da ADMA, não possui um papel direto como inibidor das NOS, mas como um competidor de transportadores específicos da L-arginina, reduzindo seu influxo para dentro do compartimento celular [58]. Isto pode levar a situações onde o endotélio não possui quantidade suficiente do substrato para a síntese de NO, apesar dos níveis plasmáticos de L-Arginina poderem se situar em valores normais[59]. Além disso, a SDMA também age como uma inibidora da receptação de L-arginina no túbulo distal dos nefrons[60], resultando em maior excreção da L-Arginina e, portanto, reduzindo consideravelmente seus níveis plasmáticos [59]. Apesar de ser mais relacionada ao risco de desenvolvimento de doenças renais, a SDMA é relacionada também ao risco de

desenvolvimento de doenças cardiovasculares por redução na biodisponibilidade do NO endógeno [61; 62; 63; 64].

Algumas enzimas possuem o papel de regulação das formas metiladas da L-arginina, com a finalidade de ajustar e reduzir danos causados pela diminuição na produção do NO. As principais enzimas responsáveis pela degradação da ADMA e SDMA são as enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1 e 2 (DDAH1 e DDAH2) e Alanina-Glioxilato Aminotransferase2 (AGXT2) [52]. As enzimas DDAH1 e DDAH2 são as principais responsáveis pela maior parte da degradação da ADMA e a AGXT2 é principal responsável pela degradação da SDMA e, ainda, participa de cerca de 16% da degradação celular da ADMA [65].

Figura 2 – Arginina e suas formas metiladas



L-NMMA, monometilarginina; ADMA, dimetilarginina assimétrica; SDMA, dimetilarginina simétrica. Adaptado de Masuda (2008) [66].

1.4. A enzima Alanina-Glioxilato Aminotransferase2 (AGXT2)

Uma das vias de metabolização, tanto da ADMA, como da SDMA, assim como já citado anteriormente, é pela enzima Alanina-Glioxilato Aminotransferase2 (AGXT2). Tal enzima possui sua maior expressão nos rins e no fígado [58; 67]. O gene homônimo, que a codifica é localizado no cromossomo 5 [68; 69]. A síntese da AGXT2 ocorre no citoplasma, logo após, é transportada para a mitocôndria, onde ocorre um processo de clivagem, levando a formação da enzima madura, sendo esta, sua forma funcional [70]

Ao longo dos estudos realizados com a AGXT2, pesquisadores têm encontrado diversas associações com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente em se tratando da atividade enzimática sobre ADMA e SDMA [58; 59; 67; 71; 72]. ADMA e da

SDMA afetando a biodisponibilidade endógena do NO também já foram retratados em alguns estudos [58; 68; 73; 74; 75].

Além do mais, um estudo de 2012, realizado na Itália, mostrou a atividade de formas metiladas da L-arginina na disfunção erétil, onde, maiores níveis de ADMA e SDMA foram associados à disfunção erétil vascular, quando comparados a um grupo controle [76]. Polimorfismos genéticos da *AGXT2* também têm sido associados à doenças cardiovasculares, em especial, aquelas onde há redução da formação de NO [58; 59; 67; 71; 72; 73; 74].

1.5. Polimorfismos genéticos e AGXT2

O ácido desoxirribonucleico (DNA), pode sofrer diversos tipos de mutações. Em alguns casos, quando a frequência da alteração está presente em mais de 1% da população, essas mutações são chamadas de polimorfismos genéticos. Os polimorfismos são herdados e podem persistir em uma população quando não causam alterações graves no que diz respeito ao desenvolvimento, crescimento e reprodução do ser estudado em questão. Quando a mutação causa efeitos graves, podemos ter fetos inviáveis ou adultos com dificuldade de reprodução, o que leva a uma pressão evolutiva contra essa nova variante.

Polimorfismos genéticos podem aparecer de diferentes formas, sendo a mais comum chamada "*Single Nucleotide Polymorphism"*(SNP), ou polimorfismo de base única. Existem também variantes no número de cópias, chamados de microssatélites, "*Variable Number of Tandem Repeats"*(VNTR), polimorfismos com número variável de repetições; e inserções ou deleções. Os diferentes alelos de um locus podem ser chamados ancestral (quando se sabe o alelo original que sofreu a mutação) e variante (qualquer novo alelo situado em um determinado locus). É importante no estudo de polimorfismos verificar que esses sejam comuns na população, e para isto, verifica-se a frequência do segundo

alelo mais frequente *Minor Alele Frequency* (MAF) [77]. No presente estudo escolhemos polimorfismos com MAFs maiores que 10%.

Em alguns casos, o mesmo gene pode trazer mais de um polimorfismo e, estes, podem ser herdados em conjunto, chamados de haplótipos. Os haplótipos são determinados de acordo com a combinação de diferentes alelos para um dado conjunto de diferentes polimorfismos [77]. Em determinados casos, os haplótipos podem ser menos frequentes, ou que raramente ocorram, em compensação, existem casos que os haplótipos podem ocorrer de maneira mais frequente, hereditariamente sendo repassadas com mais facilidade. A este processo é dado o nome de bloco haplotípico [77].

Estudos têm relacionado polimorfismos genéticos da *AGXT2* com risco de desenvolvimento para doenças cardiovasculares conhecidas e que envolvam de maneira significativa o contexto do NO [49; 58; 67; 71; 72]. Além disso, se mostraram associações entre polimorfismos genéticos e diferentes concentrações plasmáticas de ADMA e SDMA [68; 71; 73; 74]. Avaliando o conjunto de informações clínicas disponíveis, foram selecionados para este estudo os SNPs rs37369 e rs16899974.

O SNP rs37369 está localizado na região codificadora do gene *AGXT2*, e é caracterizado pela troca de um alelo C para um alelo T (C>T), resultando em uma alteração de aminoácido, variando de Valina para Isoleucina na posição 140 (Val140Ile), sendo esta, associada a atividade enzimática da AGXT2 [78]. O polimorfismo em questão já foi diretamente associado aos níveis de SDMA no plasma [73; 78] assim como com o risco para doenças coronarianas e cardiovasculares [79; 80; 81], para hipertensão arterial [58], à variabilidade na frequência cardíaca em adultos jovens [72].

O SNP rs16899974 é caracterizado pela troca de um alelo C para um alelo A (C>A), também resultando em um aminoácido alterado, variando de uma Valina para uma

Leucina, na posição 498 (Val498Leu). Esta alteração foi associada a alterações na atividade enzimática da AGXT2 [73]. O SNP está associado diretamente aos níveis plasmáticos de SDMA, assim como o SNP anterior [72]. Está também associado ao risco para fibrilação atrial e acidente vascular encefálico isquêmico [82], doença arterial coronariana [83] e doenças cardiovasculares [84].

A tabela 2 traz dados e evidências acerca dos polimorfismos acima citados, com o objetivo de dinamizar a visualização e compreensão para escolha dos mesmos no presente estudo.

Tabela 2: Evidências clínicas e funcionais de polimorfismos do gene *AGXT2*

SNP	Alelos (MAF)*	Fenótipos associados
AGXT2		
rs37369	C/T (0.39)	• SNP associado a maiores níveis de SDMA no plasma [73; 85] e BAIB no plasma e urina [73]; • Foi associado com hipertensão em humanos [86], à doença cardíaca coronária em fumantes e pacientes com diabetes mellitus [87], e com índices da variabilidade da frequência cardíaca de curto prazo em adultos jovens [88]; • Troca não sinônima Val140Ile, impacto funcional na atividade enzimática [85].
rs16899974	C/A (0.24)	• SNP associado a maiores níveis de SDMA e a índices de variabilidade da frequência cardíaca de curto prazo em adultos jovens [88]; • Foi relacionado com diferenças significantes das concentrações no plasma e na urina de β-aminoisobutirato (BAIB - metabólito da AGXT2) [73]; • Troca não sinônima Val498Leu, impacto funcional na atividade enzimática [73]

*MAF, minor allele frequency; frequência do alelo variante.

1.6. Tratamento da disfunção erétil

Inicialmente, o tratamento para a disfunção erétil é baseado em mudanças graduais de hábitos de vida. É comprovada a relação entre estilo de vida pouco saudável e a possível aparição da condição[12] Estudos revelam que o tabaco é um dos principais agentes atuantes em tal condição[12; 89]. Isso se deve ao fato de toxinas, como a nicotina, serem absorvidas para a corrente sanguínea após o consumo do tabaco, dificultando a atuação plasmática de substâncias como o NO, por exemplo, induzindo a disfunção endotelial, levando a uma menor produção do NO endógeno[12; 89]. Ainda, leva-se em consideração o tabaco como um preditor de risco para doenças cardiovasculares, que também são influenciadas negativamente pela menor produção e atuação do NO[50; 89]. Estudos demonstram a melhora na vida sexual de homens que param de fumar[89] Além disso, houve uma associação entre o uso de tabaco e maior frequência de DE na etiologia vascular[89]. A prática de exercícios físicos também tem sido altamente associada para a diminuição da prevalência de DE, assim como de doenças cardiovasculares, podendo ser um fator importante na prevenção e melhora de pacientes com ambas as condições[2]. Um estudo comparou um grupo de sedentários e um grupo de praticantes de exercício físico por pelo menos três horas na semana e associou-os a uma redução de cerca de 30% no risco para desenvolvimento de DE no grupo praticante de exercícios físicos [90]. Estes, entre outros tipos de mudanças, como controle de diabetes, hipertensão, obesidade são fortemente associados na melhora ou prevenção da DE [91].

Em alguns casos, somente mudança nos hábitos de vida não são suficientes para a prevenção da DE, sendo então necessária a introdução da terapia medicamentosa. O tratamento de primeira escolha para estes casos, se baseia em inibidores da Fosfodiesterase tipo 5 (iPDE-5). O Sildenafil, assim como o Tadalafil e Vardenafil são representantes desta classe de medicamentos. A sua maior seletividade pela PDE-5, que é a mais presente nos corpos cavernosos do pênis, faz com que este seja um medicamento

com forte ação sobre o corpo cavernoso e leito pulmonar, o que justifica a ação na disfunção erétil, sem afetar tanto outros tecidos [5; 92; 93]. Estima-se que a eficácia deste tratamento atinge por volta de 80% dos pacientes [93]. A ação dos iPDE-5 se baseia na premissa de que, inibindo a PDE-5, se aumenta os níveis plasmáticos de GMPc, seguido de desfosforilação de cadeias leves de miosina e consequente amplificação da sinalização para relaxamento da musculatura lisa nos corpos cavernosos, conseguindo assim, obtenção e manutenção da ereção [93; 94]. Existe a possibilidade de, como dito anteriormente, o iPDE-5 não ser totalmente eficaz no tratamento da DE. Isso se deve ao fato de que nem todos respondem da mesma maneira ao medicamento, ou mesmo de fatores como o uso de outros medicamentos em combinação com os iPDE-5, diabetes, doenças vasculares, prostatectomia radical (mesmo com preservação nervosa local), entre outros[95; 96; 97].

Existem outras possibilidades de tratamento para a DE, quando não há responsividade com o uso dos iPDE-5. A injeção intracavernosa se mostra como uma opção, onde, com o uso de substâncias consideradas vasoativas, como a Prostaglandina E1, Fentolamina e Clorpromazina diretamente nos corpos cavernosos, resulta em vasodilatação e consequente ereção [98]. Outra alternativa, considerada como a última na linha de tratamento para a DE é a prótese peniana, que consiste em uma haste flexível, introduzida nos corpos cavernosos do pênis. Esta haste pode ser regulada em três modos, uma para atividade sexual, uma para urinar e outra para quando o pênis estiver em repouso por baixo das roupas[99]. As próteses funcionam com um sistema hidráulico, para manipulação, fazendo com que o homem possa atingir uma ereção [99].

Uma vez que o insucesso na terapia da DE incorre em sofrimento para o paciente e familiares, é importante o estudo de marcadores que acelerem o processo de encontrar a terapia mais adequada para determinado indivíduo. Neste contexto, o estudo de

biomarcadores genéticos é muito útil. De fato, estudos passados mostraram que polimorfismos genéticos da eNOS e da nNOS podem afetar diretamente o tratamento com iPDE-5 e as concentrações plasmáticas de um metabólito do NO, o nitrito [100; 101]. Além disto, as concentrações plasmáticas de nitrito podem estar associadas com a resposta aos iPDE-5 [102]. Desta maneira, também surge como hipótese para este estudo a ideia de que polimorfismos genéticos da AGXT2, que são diretamente ligados com a biodisponibilidade de ADMA e SDMA, podem também ser marcadores na alteração da resposta ao tratamento com os iPDE-5.

Hipótese

2. HIPÓTESE

As hipóteses do presente estudo são que polimorfismos genéticos da *AGXT2* se relacionam com uma vulnerabilidade endógena a desenvolver DE, e também se associam ao resultado da terapia medicamentosa com inibidores da PDE-5.

Objetivo

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Investigar biomarcadores para Disfunção Erétil e para o resultado do tratamento medicamentoso com iPDE-5.

3.2. Objetivos específicos

Verificar se polimorfismos genéticos da *AGXT2* (rs37369 e rs16899974) estão associados com a Disfunção Erétil.

Verificar se polimorfismos da *AGXT2* estão associados com o tratamento com o Sildenafil (inibidores da PDE5).

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção de participantes

Trata-se de um estudo de dois braços, um do tipo caso-controle e outro onde participantes fizeram o uso da medicação por pelo menos 1 mês ou 8 doses da mesma e foi feita uma avaliação pré/pós tratamento.

No primeiro braço (estudo caso/controle), foram incluídos 136 homens no grupo pacientes (somente pacientes com DE clínica) e 98 no grupo controles. No braço de resposta ao Sildenafil, foram selecionados 143 participantes, sendo eles divididos em 71 com DE pós-prostatectomia (DEPP) e 72 com DE clínica (DEC).

Os pacientes convidados a participar deste estudo foram recrutados do ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), sob a coordenação do Prof. Dr. Silvio Tucci Junior, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). O Convite para a participação é feito de forma discreta, preservando o participante, o pesquisador e a pesquisa, seguindo protocolo recomendado pelo comitê de ética e mantendo o sigilo necessário. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EERP- USP), sob número CAAE: 89770618.2.0000.5393.

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. Já os critérios de exclusão foram: resultado do questionário IIEF com pontuação $\geq$ 26 no domínio Função Erétil; presença de hipogonadismo ou hipotireoidismo; 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. Para o grupo DEPP, foram incluídos voluntários que tenham passado por cirurgia de prostatectomia radical há mais de um ano e que apresentam algum grau de DE. O grupo DEC consiste em voluntários que apresentam algum grau de DE, que não passaram por intervenção cirúrgica, e a DE apresentada provém de outros meios, como disfunção endotelial, e outras supracitados.

Não houve nenhuma alteração no esquema de diagnóstico ou terapêutico do participante selecionado, visto que este estudo é de caráter observacional. Tais procedimentos eram de responsabilidade exclusiva do profissional do Ambulatório de Urologia do HCFMRP.

Todos os participantes voluntários leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – anexo 1) e após a leitura e assinatura do mesmo, foi aplicado o questionário IIEF (anexo2). Logo em seguida, foi coletado sangue, por punção venosa em tubos a vácuo de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), gel e heparina de sódio, utilizando os procedimentos mais adequados e preconizados para que não haja prejuízo ao participante. Após centrifugação, obtivemos amostras de sangue total, soro e plasma e foram armazenadas em freezers de -20ºC (sangue total) e -80ºC (plasma e soro). Houve reaplicação do questionário IIEF em pacientes que fizeram o uso de sildenafil, em seu domicílio, sob demanda, por, pelo menos, oito vezes, ocorrendo de acordo com o retorno do paciente na consulta do Ambulatório de Urologia do HCFMRP.

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 reposta 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) *score* IIEF pós-tratamento – *score* IIEF pré-tratamento = ΔIIEF;

b) 30 – *score* IIEF pré-tratamento = MRP; e

c) (ΔIIEF / MRP). 100 = ΔIIEF%.

Onde, MRP = máxima resposta possível e ΔIIEF% = percentagem da MRP atingida pelo paciente.

Os valores de ΔIIEF e de ΔIIEF% foram utilizados para medir as respostas dos pacientes ao tratamento da DE com sildenafil. Ainda, para avaliar a qualidade da resposta ao fármaco, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a mediana dos valores de ΔIIEF%: 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.

4.3. Dados bioquímicos

O perfil lipídico (colesterol total, triglicérides, lipoproteína de alta densidade), níveis de glicose, testosterona, uréia e creatinina foram mensurados através de Kits comercialmente disponíveis (Lab Test, Brasil).

4.4. Nitrito

As avaliações de Nitrito foram realizadas utilizando amostras de plasma-heparina pelo método de quimiluminescência baseado na detecção por aparelho quantificador de NO (Sievers 280i Boulder, CO, USA), após sofrer redução via solução de Triiodeto. Dados gerados por colaborador.

4.5. 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 6280 g a 4ºC. 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 ressupendidos 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 etilenodiaminotetraacético (TE) e 300 µL de fenol, com posterior homogeneização por inversão durante 5 minutos, centrifugação por 15 minutos a 6280g a 4ºC, 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 aproximadamente 1/10 deste volume de acetato de sódio 3 M pH 5,4 e duas vezes o volume de etanol absoluto gelado (-20ºC) em cada tubo, que foram armazenados em freezer a - 20ºC 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 7700 g 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 ºC 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 - 20ºC. Partindo das amostras concentradas, foram feitas soluções de trabalho de DNA a 5 ng/µL para as análises, que foram armazenadas em geladeira.

4.6. Genotipagens

Os polimorfismos rs37369 e rs16899974 foram genotipados utilizando ensaios de discriminação alélica TaqMan (códigos do fabricante C__11162986_1_ e C__25742181_10, respectivamente). Todas as reações foram realizadas utilizando técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real no aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems).

4.7. Estimativa de Haplótipos.

Haplótipos foram inferidos usando o programa PHASE v2.1 (http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html). Os possíveis haplótipos incluídos no estudo para polimorfismos do gene *AGXT2* (rs37369 C>T e rs16899974 C>A) foram CA, TA, CC e TC. Haplótipos com frequência <1% foram desconsiderados das análises.

4.8. Análises Estatísticas

As características clínicas e laboratoriais dos participantes da pesquisa foram comparadas entre pacientes e controles utilizando teste t não pareado, teste Mann Whitney ou teste de qui-quadrado (χ^2), quando apropriados. O teste χ^2 também foi utilizado para analisar possíveis desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para comparar as frequências de genótipos e haplótipos dos polimorfismos estudados entre pacientes e controles e, também, entre os grupos de bons e maus respondedores ao Sildenafil. Os valores médios das pontuações no IIEF e das medidas de resposta ao tratamento com Sildenafil foram comparados entre portadores de diferentes genótipos e haplótipos por meio de teste de Kruskall-Wallis com pós-teste de Dunn ou teste de Mann Whitney, quando apropriados. Todas as análises foram corrigidas por fatores de confusão por meio de análises de regressão linear multivariada ou regressão logística multivariada, quando apropriadas, utilizando o software JMP 5.0.0 (SAS Institute). Em todo o estudo, os genótipos foram analisados nos três diferentes modelos de herança (aditivo, dominante e recessivo). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

5. RESULTADOS

Para uma melhor organização dos resultados vamos apresentar os braços caso-controle e resposta ao sildenafil de forma isolada em “estudo 1” e “estudo 2”.

ESTUDO 1: CASO-CONTROLE

A tabela 3 traz dados das características clínicas e laboratoriais do Estudo 1 – Caso-Controle. Ao todo foram 234 participantes estudados, sendo divididos em 98 participantes do grupo Controles, que são saudáveis e 136 participantes do grupo Pacientes, que possuem diagnóstico médico de DE. Houve diferença estatística entre os grupos para Idade, tabagismo, Colesterol Total, Colesterol LDL, Colesterol HDL, Glicose, Creatinina, Hipertensão, Diabetes, Score FE e concentração de Nitrito. Algumas diferenças nos valores de Idade, PAS, Score FE, Diabéticos e Hipertensos são esperados para o grupo pacientes, já que estas são características clínicas relacionadas à fatores de risco para desenvolvimento de DE ou à função erétil propriamente dita (Score FE).

As tabelas 4 e 5 mostram, respectivamente, a distribuição de genótipos e haplótipos dos polimorfismos estudados para os grupos Controles e Pacientes. Os dados estão mostrados em frequências relativas (n) para ambas as análises. Não foram encontradas associações significativas entre os grupos, nas duas análises, mesmo após realizada a análise de regressão logística multivariada

Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

Características	Controles (n = 98)	Pacientes (n = 136)
Idade (anos)	47 ± 9	55 ± 11*
Etnia (brancos/não brancos)	52/46	69/67
IMC (Kg/m^2)	27,7 ± 4,3	28,0 ± 4,7
Praticam atividade física (%)	60	54
Tabagismo (n)		
Fumantes	15	20
Ex-fumantes	23	66*
Não fumantes	60	50
Etilismo[a] (n)	11	13
PAS (mmHg)	130 ± 19	137 ± 19*
PAD (mmHg)	88 ± 13	88 ± 12
Colesterol total (mg/dL)	201 ± 42	181 ± 38*
Colesterol HDL (mg/dL)	36 ± 11	41 ± 9*
Colesterol LDL (mg/dL)	127 ± 38	112 ± 35*
Triglicerídeos (mg/dL)	175 ± 106	161 ± 111
Glicose (mg/dL)	100 ± 41	127 ± 54*
Ureia (mg/dL)	35 ± 9	33 ± 12
Creatinina (mg/dL)	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,3*
Hipertensos (%)	0	47*
Diabéticos (%)	5	39*
Score FE	29 ± 1	10 ± 7*
ADMA (μM)	0,90 ± 0,33 (n = 87)	0,81 ± 0,32 (n = 88)
Nitrito (nM)	134 ± 73 (n = 92)	192 ± 169 (n = 116)*

IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; *Score* FE, pontuação referente ao domínio função erétil do questionário Índice Internacional de Função Erétil. [a] **C**onsumo de etanol >30 g/dia. Dados expressos como média ± desvio padrão, valores absolutos (n) ou frequências relativas (%). * P <0,05 *versus* Controles

Tabela 4 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre os grupos Controles e Pacientes

SNP	Genótipo	Controles (n = 98)	Pacientes (n = 136)	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
AGXT2							
rs16899974	CC	62 (0,63)	99 (0,73)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	AC	31 (0,32)	32 (0,23)	0,204	0,69 (0,38 – 1,23)	0,934	0,94 (0,21 – 4,63)
	AA	5 (0,05)	5 (0,04)	0,176	0,38 (0,09 – 1,63)	0,494	0,41 (0,03 – 4,84)
		P_{HW} = 0,937	**P_{HW} =** 1,000				
		P_{nc} Geral = 0,218					
		P_c Geral = 0,250					
rs37369	CC	57 (0,58)	90 (0,66)	-	1,00 (referência)		1,00 (referência)
	TC	34 (0,35)	37 (0,27)	0,201	0,69 (0,39 – 1,22)	0,995	0,99 (0,30 – 3,20)
	TT	7 (0,07)	9 (0,07)	0,699	0,81 (0,29 – 2,31)	0,543	0,57(0,09 – 3,74)
		P_{HW} = 0,931	**P_{HW} =** 0,592		**P_{nc} Geral =** 0,437		**P_c Geral =** 0,578

R^2 = 0,25. SNP, *single nucleotide polymorphism*; P_{nc}, valor de P referente a estatística não corrigida; P_c, valor de P referente a estatística corrigida; OR_{nc}, valor de odds ratio referente a estatística não corrigida; OR_c, valor de odds ratio referente a estatística corrigida; IC, intervalo de confiança de 95%; P_{HW}, valor de P referente ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dados mostrados como n (frequências relativas).

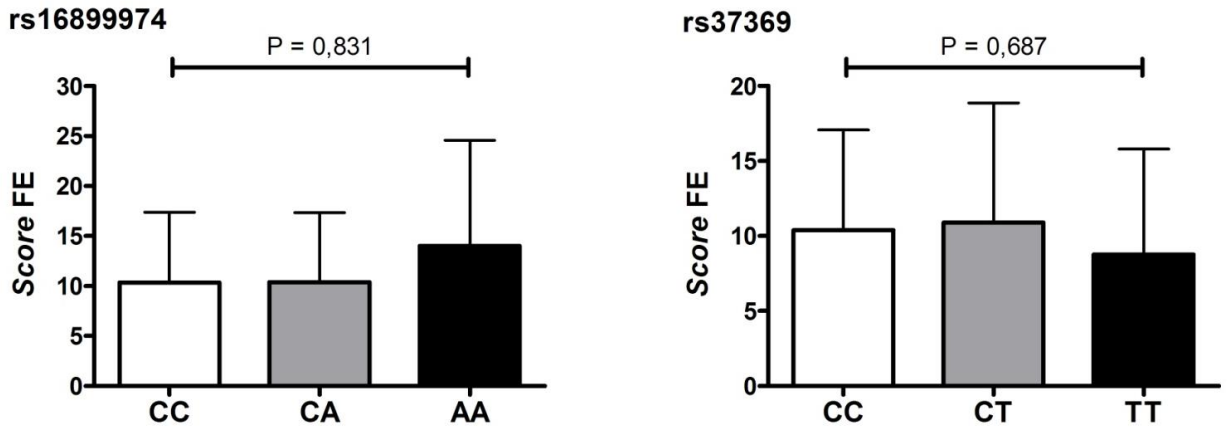
Tabela 5 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *AGXT2* entre os grupos Controles e Pacientes

SNP	Haplótipo	Controles (n = 196)	Pacientes (n = 272)	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
AGXT2							
	CC	124 (0,63)	191 (0,70)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	CT	31 (0,15)	41 (0,15)	0,564	0,86 (0,51 – 1,44)	0,430	1,50 (0,55 – 4,12)
	AC	23 (0,12)	27 (0,10)	0,374	0,76 (0,42 – 1,39)	0,897	1,08 (0,35 – 3,33)
	AT	18 (0,10)	13 (0,05)	0,045	0,47 (0,22 – 0,99)	0,098	0,31 (0,08 – 1,22)
					P_{nc} Geral = 0,208		**P_c Geral =** 0,220

R^2 = 0,24. SNP, *single nucleotide polymorphism*; P_{nc}, valor de P referente a estatística não corrigida; P_c, valor de P referente a estatística corrigida; OR_{nc}, valor de odds ratio referente a estatística não corrigida; OR_c, valor de odds ratio referente a estatística corrigida; IC, intervalo de confiança de 95%. Dados mostrados como n (frequências relativas).

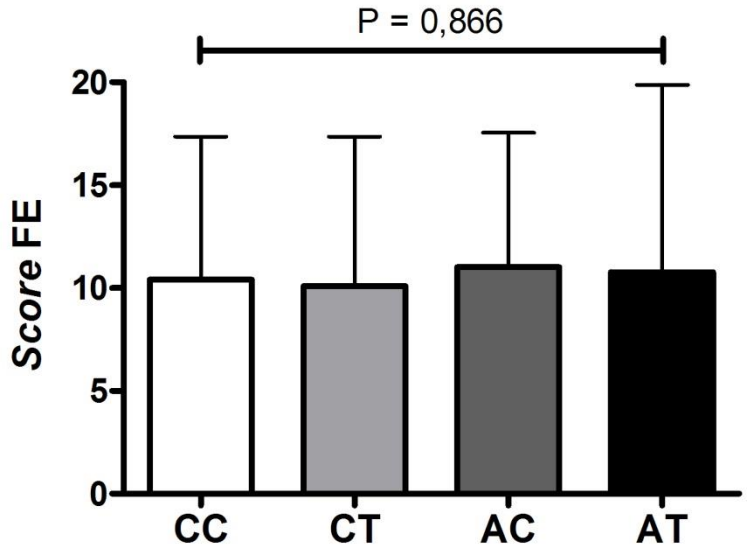
Em seguida avaliamos se os genótipos estão associados a outro parâmetro clínico que caracteriza a DE, a gravidade dos sintomas avaliada pelo IIEF. As figuras 3 e 4 trazem o Score FE relacionados aos genótipos e haplótipos, respectivamente, dos polimorfismos estudados, no grupo Pacientes.

Figura 3 – *Score* FE *vs* genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Pacientes



Valores do score de função erétil expressos como média ± desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 4 – *Score* FE *vs* haplótipos do gene *AGXT2* - grupo Pacientes



Valores do score de função erétil expressos como média ± desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

As tabelas 6 e 7 mostram, respectivamente, a regressão linear multivariada do efeito dos genótipos e haplótipos sobre os valores do Score FE no grupo Pacientes. Vale a pena ressaltar que as duas análises apresentadas nas figuras 3 e 4 e nas tabelas 6 e 7 foram realizadas apenas com o grupo Pacientes, por se tratar do grupo que apresenta maior variabilidade dos valores de IIEF, sendo diagnosticados com algum grau de DE. O grupo Controles é um grupo saudável, com uma pequena faixa de variabilidade entre os indivíduos. Nesse sentido fica mais difícil detectar a influência genética sobre o IIEF.

Tabela 6 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de *score* FE no grupo Pacientes

Modelo	**Pacientes (n =136)**	
	R^2 = 0,13	**RMSE = 6,80**
	β	**P**
Idade	-0,199	0,001*
Tabagismo		
Fumante	-0,785	0,483
Ex-fumante	+0,934	0,287
Não fumante	-0,149	0,865
Ser diabético	-1,020	0,095
AGXT2		
rs16899974	**P Geral** = 0,737	
CC	-1,021	0,487
CA	-1,088	0,486
AA	+2,110	0,436
rs37369	**P Geral** = 0,901	
CC	+0,375	0,711
CT	+0,385	0,734
TT	-0,760	0,649

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. * P <0,05 significativo.

Tabela 7 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de *score* FE no grupo Pacientes

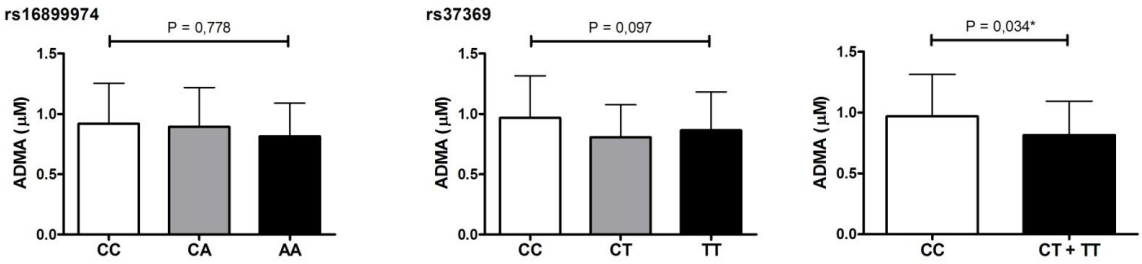
Modelo		**Pacientes (n = 272)**	
		R^2 = 0,12	**RMSE = 6,69**
		β	**P**
Idade		-0,203	<0,001*
Tabagismo			
Fumante		-0,867	0,263
Ex-fumante		+1,017	0,092
Não fumante		-0,149	0,806
Ser diabético		-0,991	0,019*
AGXT2		**P Geral =** 0,971	
	CC	-0,071	0,921
	CT	-0,406	0,679
	AC	+0,400	0,720
	AT	+0,077	0,958

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. * P <0,05 significativo.

Em seguida, foi analisado a influência dos genótipos em relação às concentrações plasmáticas de ADMA. As figuras 5 e 6 mostram as concentrações plasmáticas de ADMA nos portadores dos genótipos dos polimorfismos estudados nos grupos Controles e Pacientes, respectivamente. Na figura 5, observa-se um resultado estatisticamente significativo no modelo dominante, para o grupo Controles (P=0,034) e no modelo aditivo, um resultado borderline (P=0,097) do polimorfismo rs37369.

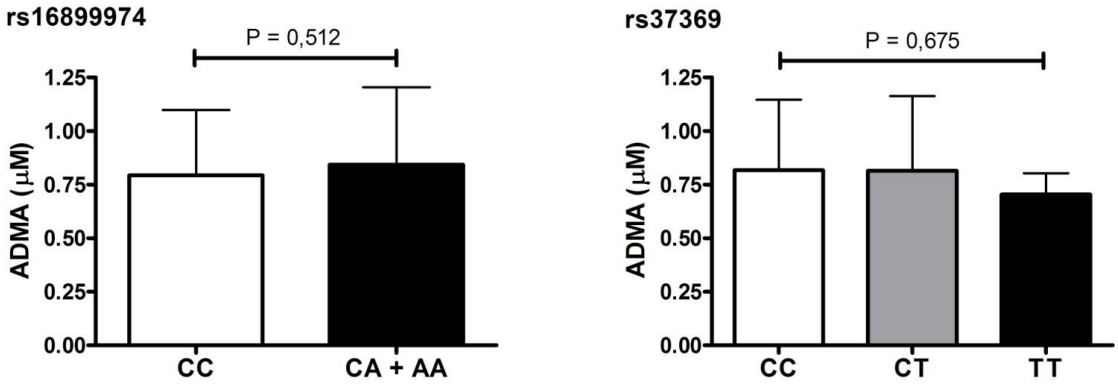
Em seguida, a tabela 8 traz a regressão linear multivariada entre os genótipos dos polimorfismos estudados e a concentração plasmática de ADMA. Observa-se, no modelo dominante, do polimorfismo rs37369 a mesma tendência mostrada na estatística não corrigida, apresentando um resultado significativo (P=0,046). Estes resultados, quando considerados conjuntamente, são fortes indícios de que há uma associação positiva de maiores concentrações de ADMA estarem associados ao genótipo CC do polimorfismo em questão. Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos para o polimorfismo rs16899974.

Figura 5– ADMA *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo Controles



Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média ± desvio padrão. Teste T de Student para o modelo dominante e ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o modelo aditivo. * P <0,05 significativo.

Figura 6 – ADMA *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo Pacientes



Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média ± desvio padrão. Devido à frequência do genótipo AA do rs16899974 ser <1% na amostra desta análise, não foi possível analisar os dados deste polimorfismo nos modelos de herança aditivo e recessivo. Teste T de Student para o modelo dominante e ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o modelo aditivo.

.

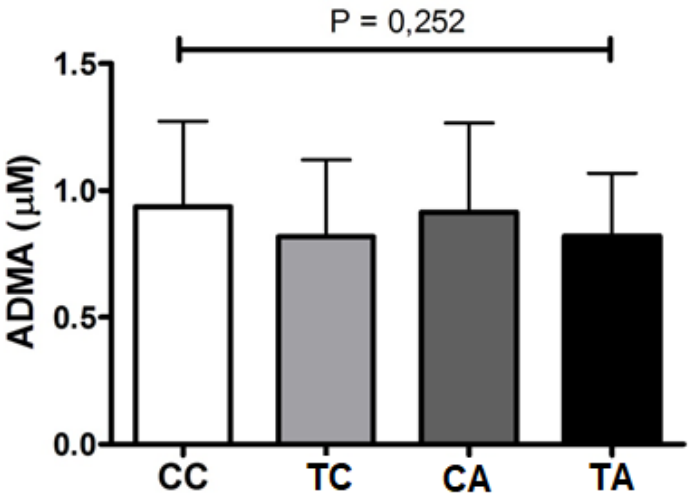
Tabela 8 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de ADMA nos grupos Controles e Pacientes

		Controles (n = 87)						**Pacientes (n = 88)**					
Modelo		**Aditivo**		**Dominante**		**Recessivo**		**Aditivo**		**Dominante**		**Recessivo**	
		R^2 = 0,14		**R^2 = 0,13**		**R^2 = 0,10**		**R^2 = 0,05**		**R^2 = 0,02**		**R^2 = 0,04**	
		RMSE = 0,16		**RMSE = 0,15**		**RMSE = 0,16**		**RMSE = 0,17**		**RMSE = 0,17**		**RMSE = 0,17**	
		B	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		-0,004	0,076	-0,004	0,082	-0,004	0,070	-0,001	0,734	<-0,001	0,978	-0,001	0,720
Tabagismo													
Fumante		-0,075	0,032*	-0,071	0,035	-0,080	0,020*	-0,021	0,497	-0,020	0,547	-0,023	0,475
Ex-fumante		+0,057	0,067	+0,053	0,072	+0,059	0,058	-0,012	0,653	-0,014	0,588	-0,010	0,682
Não fumante		+0,017	0,476	+0,018	0,457	+0,022	0,367	+0,034	0,221	+0,033	0,222	+0,033	0,217
Ser diabético		+0,048	0,253	+0,045	0,272	+0,050	0,232	+0,001	0,953	+0,003	0,888	<-0,001	0,981
AGXT2													
rs16899974	CC	+0,011	0,734	+0,006	0,724	+0,012	0,772	+0,070	0,262	-0,006	0,770	+0,109	0,210
	AC	<-0,001	0,992	-0,006	0,724			+0,088	0,170	+0,006	0,770		
	AA	-0,010	0,852			-0,012	0,772	-0,158	0,187			-0,109	0,210
		P Geral = 0,935						**P Geral** = 0,388					
rs37369	CC	+0,052	0,087	+0,035	0,046*	+0,034	0,368	+0,004	0,889	<-0,001	0,999	+0,021	0,531
	CT	-0,010	0,751	-0,035	0,046*			+0,025	0,456	<-0,001	0,999		
	TT	-0,042	0,405			-0,034	0,368	-0,029	0,518			-0,021	0,531
		P Geral = 0,157						**P Geral** = 0,751					

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de ADMA foram logaritmicamente transformados.* P <0,05 significativo

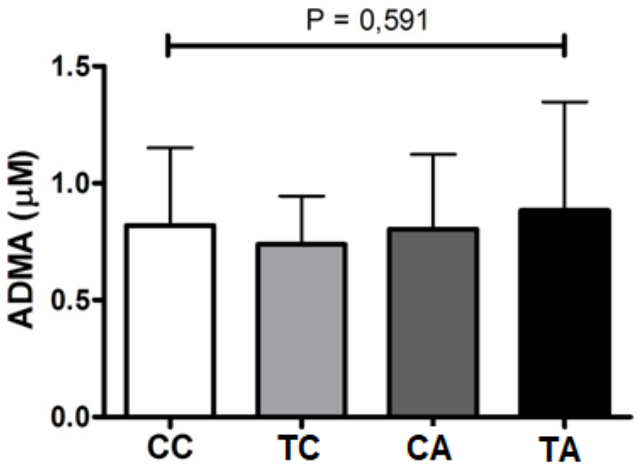
As figuras 7 e 8 representam a influência das concentrações plasmáticas de ADMA em relação aos haplótipos deste estudo. Não foram observados resultados estatisticamente significativos. A tabela 9 apresenta a regressão linear multivariada dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores das concentrações plasmáticas de ADMA para casos e para controles. Também não foram encontradas associações significativas nesta análise

Figura 7 – ADMA *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo Controles



Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 8 – ADMA *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo Pacientes



Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey

Tabela 9 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de ADMA nos grupos Controles e Pacientes

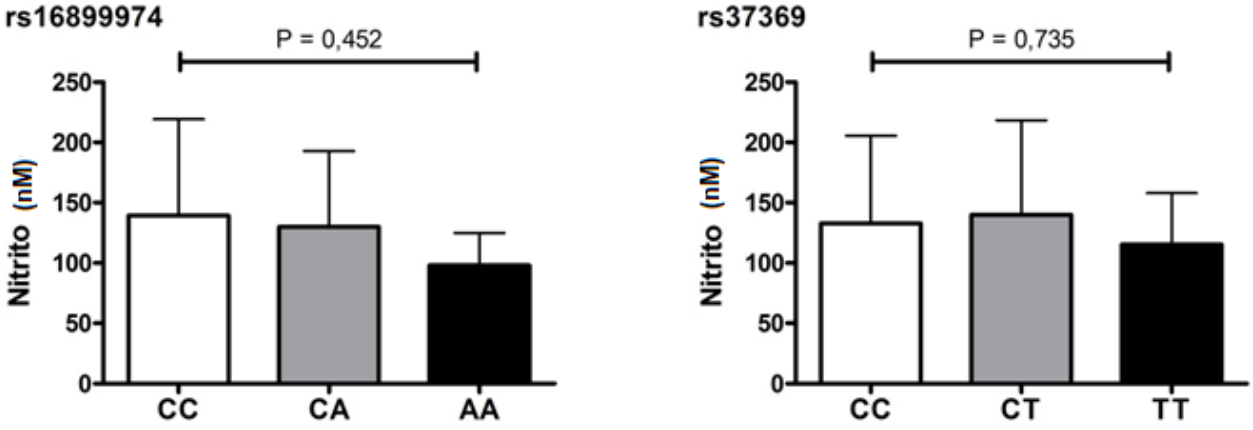
Modelo	**Controles (n = 174)**		**Pacientes (n = 176)**	
	R^2 = 0,12	**RMSE = 0,15**	**R^2 = 0,03**	**RMSE = 0,17**
	β	**P**	**β**	**P**
Idade	-0,004	0,009	<-0,001	0,908
Tabagismo				
Fumante	-0,075	0,002*	-0,020	0,376
Ex-fumante	+0,054	0,010*	-0,014	0,434
Não fumante	+0,021	0,216	+0,034	0,074
Ser diabético	+0,048	0,091	+0,003	0,844
AGXT2	**P Geral =** 0,125		**P Geral =** 0,887	
CC	0,034	0,068	+0,003	0,889
TC	-0,031	0,243	-0,018	0,558
CA	+0,031	0,291	-0,012	0,730
TA	-0,033	0,293	+0,026	0,571

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de A

Em seguida, foi analisada a influência das concentrações plasmáticas de Nitrito sobre os genótipos dos polimorfismos aqui estudados, para os grupos Controles e Pacientes. Não foram observados resultados significativos para esta análise, como mostrado nas figuras 9 e 10.

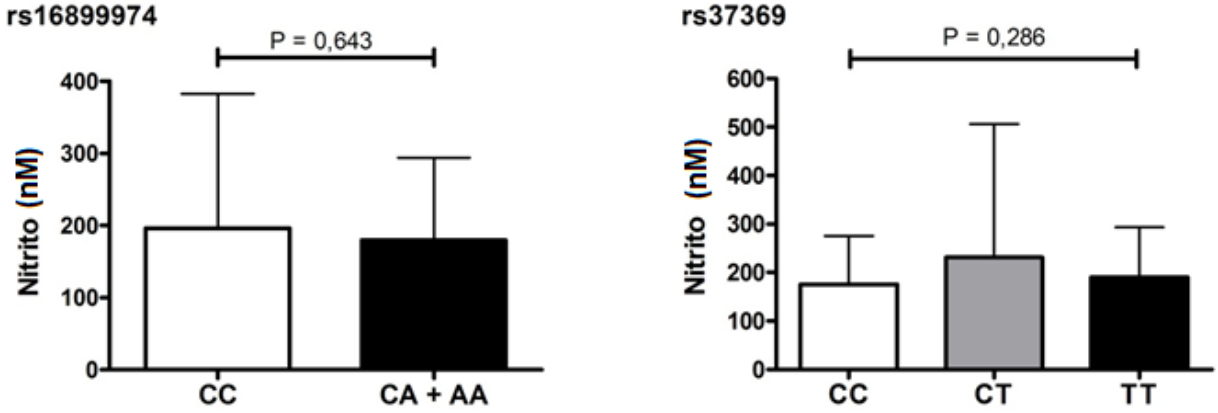
A regressão linear multivariada para estas mesmas variáveis mostrou, no modelo recessivo para o polimorfismo rs16899974 mostrou uma relação entre menores níveis de nitrito associados aos genótipos CC e CA quando comparados ao genótipo AA, como mostrado na tabela 10.

Figura 9 – Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo Controles



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 10 – Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo Pacientes



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Devido à frequência do genótipo AA do rs16899974 ser <1% na amostra desta análise, não foi possível analisar os dados deste polimorfismo nos modelos de herança aditivo e recessivo. Teste T de Student para o modelo dominante e ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o modelo aditivo.

Níveis de nitrito foram logaritmicamente transformados. * P <0,05 significativo

.

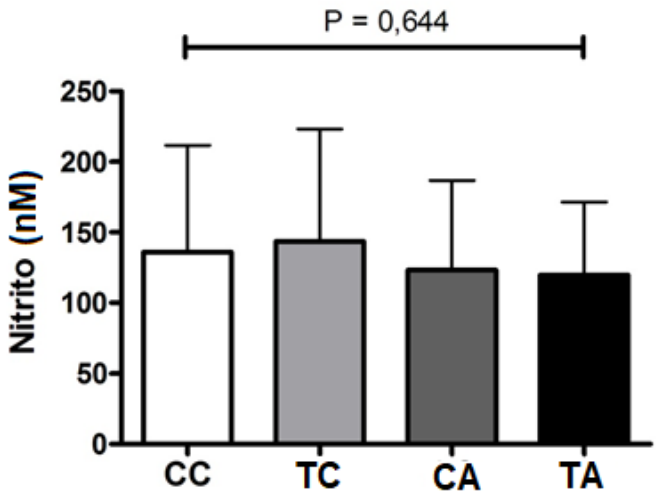
Tabela 10 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de Nitrito nos grupos Controles e Pacientes

		Controles (n = 92)						**Pacientes (n = 116)**					
Modelo		**Aditivo**		**Dominante**		**Recessivo**		**Aditivo**		**Dominante**		**Recessivo**	
		R^2 = 0,07		**R^2 = 0,05**		**R^2 = 0,06**		**R^2 = 0,10**		**R^2 = 0,06**		**R^2 = 0,09**	
		RMSE = 0,19		**RMSE = 0,19**		**RMSE = 0,19**		**RMSE = 0,24**		**RMSE = 0,25**		**RMSE = 0,24**	
		B	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**	**B**	**P**	**β**	**P**
Idade		-0,001	0,583	-0,001	0,619	-0,001	0,547	+0,003	0,240	+0,002	0,438	+0,003	0,232
Tabagismo													
Fumante		-0,039	0,316	-0,035	0,356	-0,034	0,367	+0,038	0,358	+0,033	0,432	+0,036	0,382
Ex-fumante		+0,009	0,800	+0,008	0,815	+0,005	0,897	+0,021	0,537	+0,031	0,365	+0,024	0,464
Não fumante		+0,030	0,290	+0,027	0,330	+0,030	0,282	-0,059	0,087	-0,064	0,068	-0,060	0,079
Ser diabético		-0,068	0,180	-0,066	0,179	-0,066	0,187	+0,013	0,590	+0,011	0,644	+0,012	0,620
AGXT2													
rs16899974	CC	+0,058	0,136	+0,020	0,345	+0,073	0,156	-0,176	0,047	+0,007	0,782	-0,291	0,022*
	CA	+0,036	0,398	-0,020	0,345			-0,209	0,022	-0,007	0,782		
	AA	-0,095	0,174			-0,073	0,156	+0,385	0,025			+0,291	0,022*
		P Geral = 0,318						**P Geral** = 0,072					
rs37369	CC	-0,024	0,536	-0,009	0,636	-0,020	0,683	-0,018	0,649	-0,018	0,477	-0,016	0,744
	CT	+0,004	0,928	+0,009	0,636			+0,003	0,953	+0,018	0,477		
	TT	+0,020	0,762			+0,020	0,683	+0,015	0,813			+0,016	0,744
		P Geral = 0,762						**P Geral** = 0,890					

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de nitrito foram logaritmicamente transformados. * P <0,05 significativo

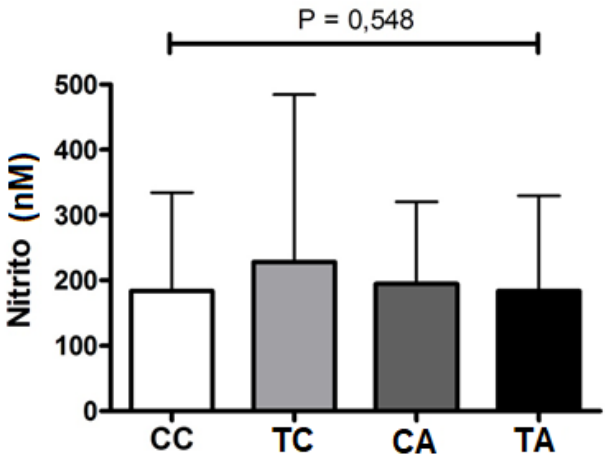
As figuras 11 e 12 mostram a influência dos haplótipos em relação às concentrações plasmáticas de Nitrito nos grupos estudados. Não foram encontrados resultados significativos para esta análise. A tabela 11 traz a regressão linear multivariada para os haplótipos em relação às concentrações plasmáticas de Nitrito para os grupos Controles e Pacientes. Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos para esta análise

Figura 11 – Nitrito *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo Controles



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 12 – Nitrito *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo Pacientes



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey

Tabela 11 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de Nitrito nos grupos Controles e Pacientes

Modelo	**Controles (n = 184)**		**Pacientes (n = 232)**	
	R^2 = 0,05	**RMSE = 0,18**	**R^2 = 0,05**	**RMSE = 0,25**
	β	**P**	**β**	**P**
Idade	-0,001	0,447	+0,002	0,276
Tabagismo				
Fumante	-0,037	0,166	+0,031	0,297
Ex-fumante	+0,010	0,690	+0,034	0,145
Não fumante	+0,027	0,154	-0,065	0,008*
Ser diabético	-0,066	0,053	+0,011	0,538
AGXT2	**P Geral** = 0,435		**P Geral** = 0,785	
CC	+0,010	0,632	-0,015	0,602
CT	+0,048	0,129	+0,028	0,474
AC	-0,024	0,473	+0,010	0,828
AT	-0,034	0,351	-0,022	0,715

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de nitrito foram logaritmicamente transformados. * P <0,05 significativo.

ESTUDO 2: RESPOSTA AO SILDENAFIL, PRÉ x PÓS TRATAMENTO

A seguir demonstramos as características clínicas dos participantes do segundo braço (Estudo de Resposta) (Tabela 12). Nessa tabela não foram feitas as comparações entre os grupos, uma vez que as etiologias são diferentes. Tivemos como objetivo ver se marcadores genéticos se associavam à resposta ao sildenafil nesses grupos de forma independente.

Tabela 12 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

Características	DEPP	DEC
N	71	72
Idade (anos)	65 ± 7	55 ± 11
Etnia (brancos/negros)	36/35	41/31
IMC (Kg/m^2)	28,1 ± 4,4	28,56 ± 4,5
Atividade física (%)	58	54
Tabagismo		
Fumantes	7	13
Ex-fumantes	34	35
Não fumantes	30	24
PAS (mmHg)	145 ± 22	139 ± 18
PAD (mmHg)	93 ± 12	91 ± 11
Colesterol total (mg/dL)	174 ± 44,3	183 ± 36,4
Colesterol HDL (mg/dL)	39 ± 5,6	41 ± 8,4
Colesterol LDL (mg/dL)	100 ± 38,2	114 ± 33,0
Triglicerídeos (mg/dL)	156 ± 81,3	143 ± 79,7
Glicose (mg/dL)	119 ± 39,3	118 ± 39,3
Hipertensos (%)	58	46
Diabéticos (%)	21	43
ADMA (μM)	0,86 ± 0,28	0,82 ± 0,35
Nitrito (μM)	153 ± 101	176 ± 101
Pontuação no IIEF		
Pré-tratamento	8,4 ± 5,6	9,6 ± 6,3
Pós-tratamento	13,4 ± 8,0	16,6 ± 8,9

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; **IIEF**, Índice Internacional de Função Erétil. Dados expressos como média ± desvio-padrão, valores absolutos ou frequência (%)

Em seguida fizemos uma divisão dos participantes de acordo com a mediana do ΔIIEF%. Os participantes acima da mediana foram classificados como bons respondedores e os abaixo da mediana foram classificados como maus respondedores. As tabelas 13 e 14 mostram a associação entre os polimorfismos estudados e bons e maus respondedores nos grupos DEPP e DEC, respectivamente. Não foi encontrada associação significativa entre os marcadores genéticos e a resposta classificada como variável dicotômica. Em seguida fizemos a mesma análise para haplótipos da *AGXT2* (Tabela 15 e 16 para DEPP e DEC, respectivamente), sem associações significativas.

Tabela 13 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre os grupos Bons Respondedores (BR) e Maus Respondedores (MR) – grupo DEPP

SNP	Genótipo	BR (n = 35)	MR (n = 33)	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
rs16899974	CC	23 (0,66)	22 (0,67)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	CA	12 (0,34)	10 (0,30)	0,792	0,87 (0,31 – 2,42)	0,928	0,002 (Unstable)
	AA	0 (0,00)	1 (0,03)	0,312	3,13 (0,12 – 81,07)	0,928	178727,011(Unstable)
		P_{nc} Geral = 0,564					
		P_c Geral = 0,995					
rs37369	CC	19 (0,54)	14 (0,42)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	CT	12 (0,34)	17 (0,52)	0,203	1,92 (0,70 – 5,29)	0,255	2,69 (0,51 – 16,51)
	TT	4 (0,11)	2 (0,06)	0,677	0,68 (0,11 – 4,24)	0,522	0,44 (0,03 – Unstable)
		P_{nc} Geral = 0,328					
		P_c Geral = 0,500					

R^2 = 0,07. SNP, *single nucleotide polymorphism*; P_{nc}, valor de P referente a estatística não corrigida; P_c, valor de P referente a estatística corrigida; OR_{nc}, valor de odds ratio referente a estatística não corrigida; OR_c, valor de odds ratio referente a estatística corrigida; IC, intervalo de confiança de 95%. Dados mostrados como n (frequências relativas).

Tabela 14 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre os grupos Bons Respondedores (BR) e Maus Respondedores (MR) – grupo DEC

SNP	Genótipo	BR (n = 36)	MR (n = 36)	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
rs16899974	CC	30 (0,83)	24 (0,67)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	CA	5 (0,14)	11 (0,30)	0,088	2,75 (0,84 – 9,00)	0,568	2,13 (0,14 – 33,68)
	AA	1 (0,03)	1 (0,03)	0,877	1,25 (0,07 – 21,60)	0,682	2,40 (0,02 – 257,15)
		P_{nc} Geral = 0,233					
		P_c Geral =0,188					
rs37369	CC	22 (0,61)	27 (0,75)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	CT	12 (0,33)	7 (0,19)	0,177	0,48 (0,16 – 1,41)	0,351	0,37 (0,04 – 2,98)
	TT	2 (0,06)	2 (0,06)	0,844	0,81 (0,11 – 6,27)	0,890	1,23 (0,05 – 27,12)
		P_{nc} Geral = 0,401					
		P_c Geral = 0,400					

R^2 = 0,13. SNP, *single nucleotide polymorphism*; P_{nc}, valor de P referente a estatística não corrigida; P_c, valor de P referente a estatística corrigida; OR_{nc}, valor de odds ratio referente a estatística não corrigida; OR_c, valor de odds ratio referente a estatística corrigida; IC, intervalo de confiança de 95%. Dados mostrados como n (frequências relativas).

Tabela 15 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *AGXT2* entre os grupos Bons Respondedores (BR) e Maus Respondedores (MR) – grupo DEPP

SNP	Haplótipo	BR (n = 70)	MR (n = 66)	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
AGXT2							
	CC	40 (0,57)	35 (0,53)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	TC	18 (0,25)	19 (0,29)	0,641	1,21 (0,55 – 2,65)	0,817	1,20 (0,26 – 5,61)
	CA	10 (0,14)	10 (0,15)	0,791	1,14 (0,43 – 3,07)	0,943	1,07 (0,18 – 6,24)
	TA	2 (0,03)	2 (0,03)	0,896	1,14 (0,15 – 8,56)	0,986	0,97 (0,04 – 25,67)
		P_{nc} Geral = 0,970					
		P_c Geral = 0,970					

R^2 = 0,04. SNP, *single nucleotide polymorphism*; P_{nc}, valor de P referente a estatística não corrigida; P_c, valor de P referente a estatística corrigida; OR_{nc}, valor de odds ratio referente a estatística não corrigida; OR_c, valor de odds ratio referente a estatística corrigida; IC, intervalo de confiança de 95%. Dados mostrados como n (frequências relativas).

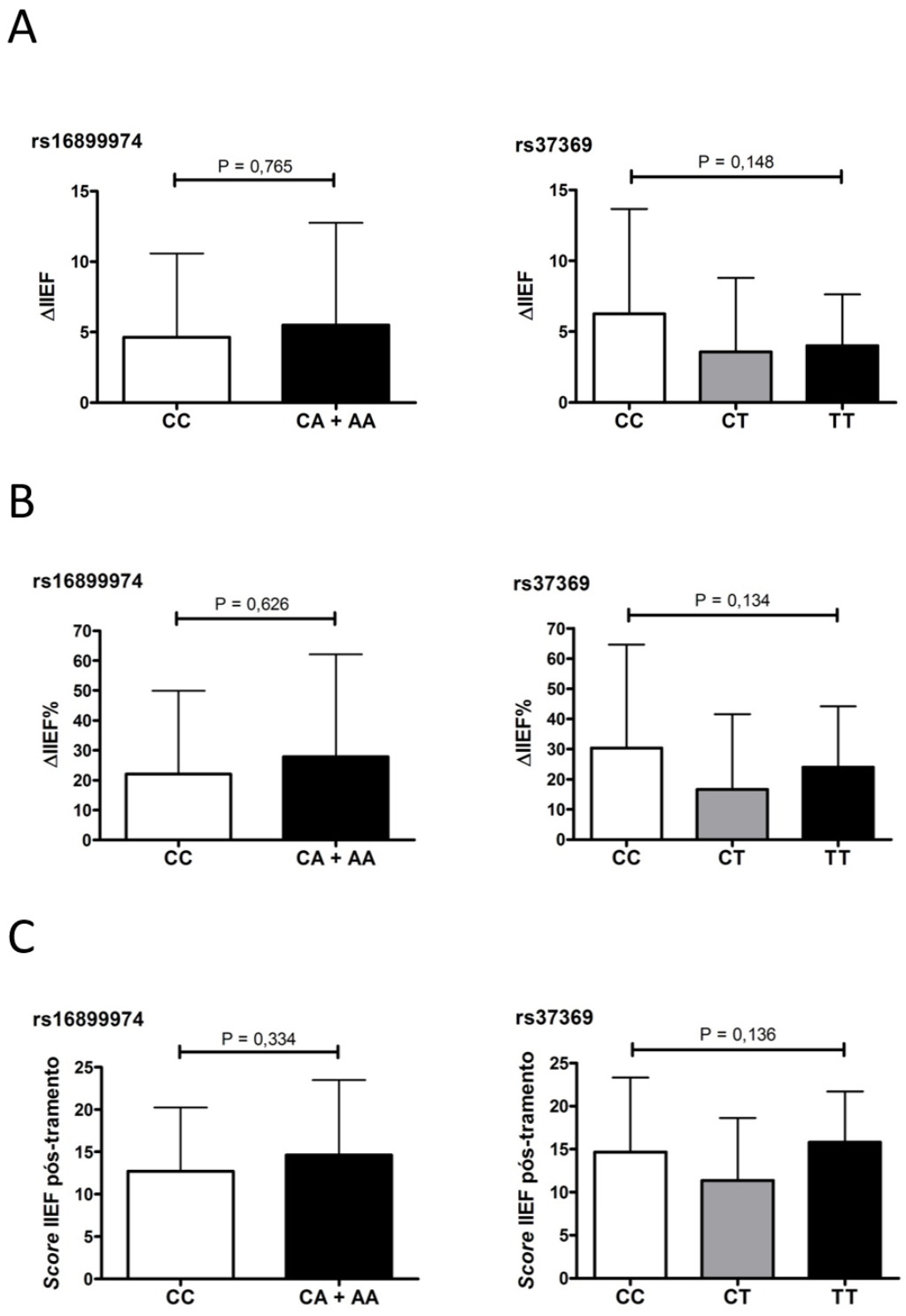
Tabela 16 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *AGXT2* entre os grupos Bons Respondedores (BR) e Maus Respondedores (MR) – grupo DEC

SNP	Haplótipo	BR (n = 72)	MR (n = 72)	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
AGXT2							
	CC	52 (0,72)	51 (0,71)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	TC	13 (0,18)	8 (0,11)	0,340	0,63 (0,24 – 1,64)	0,085	0,21 (0,03 – 1,21)
	CA	4 (0,06)	10 (0,14)	0,124	2,55 (0,75 – 8,66)	0,105	5,59 (0,75 – 52,28)
	TA	3 (0,04)	3 (0,04)	0,982	1,02 (0,20 – 5,29	0,874	1,24 (0,08 – 20,43)
		P_{nc} Geral = 0,287					
		P_c Geral = 0,225					

R^2 = 0,10. SNP, *single nucleotide polymorphism*; P_{nc}, valor de P referente a estatística não corrigida; P_c, valor de P referente a estatística corrigida; OR_{nc}, valor de odds ratio referente a estatística não corrigida; OR_c, valor de odds ratio referente a estatística corrigida; IC, intervalo de confiança de 95%. Dados mostrados como n (frequências relativas).

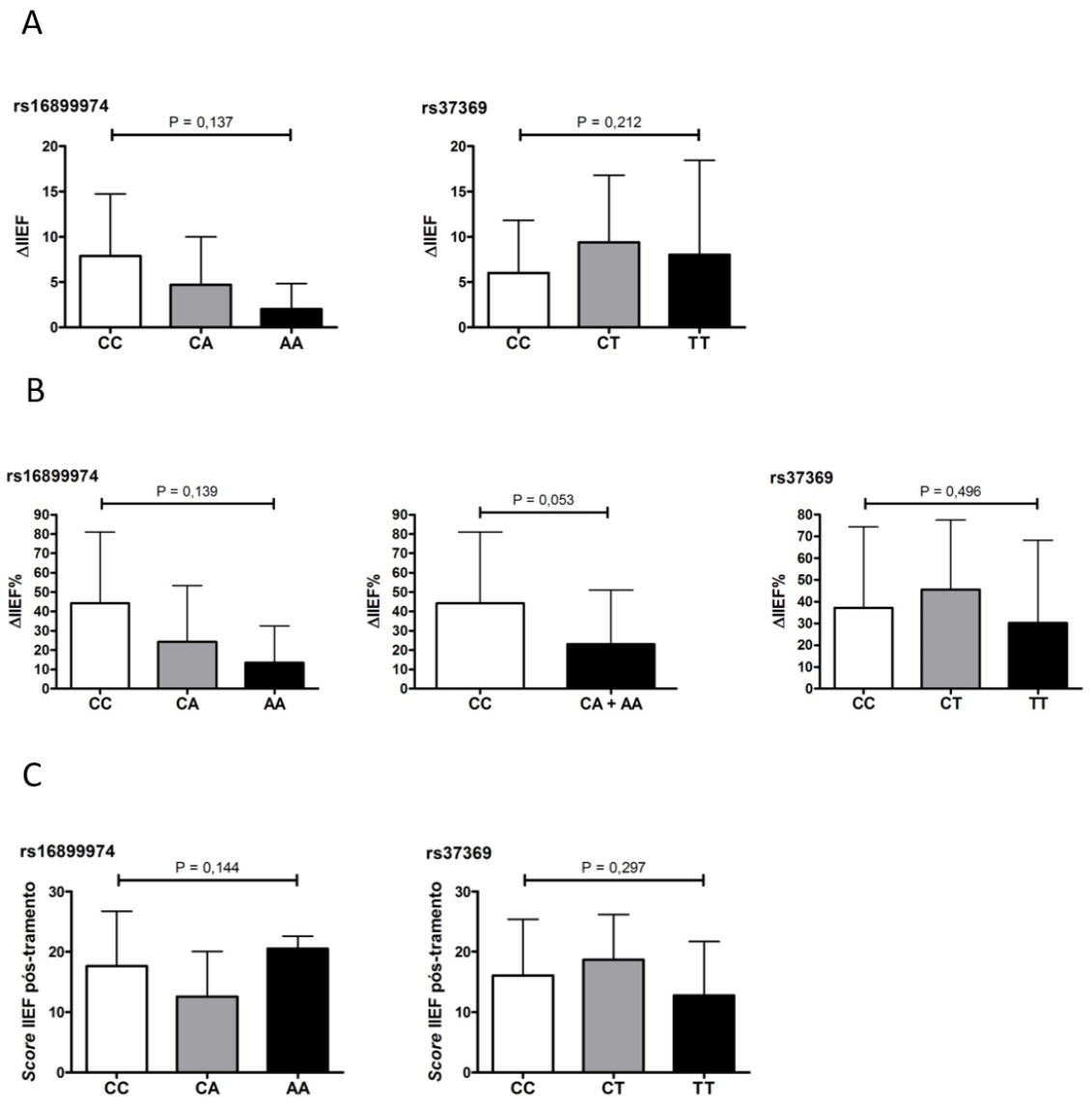
A seguir definimos a resposta ao Sildenafil de três formas, sendo uma o ΔIIEF (IIEF pós menos IIEF pré), o ΔIIEF% (uma forma normalizada do delta IIEF onde se considerou o grau inicial de disfunção) e o IIEF pós Sildenafil (que leva em consideração não "o quanto melhorou", mas "até onde se chegou"). As figuras 13 e 14 mostram as associações entre os polimorfismos e os parâmetros de resposta para os grupos DEPP e DEC, respectivamente.

Figura 13 –Associação dos genótipos dos polimorfismos estudados com os três parâmetros da resposta ao Sildenafil – grupo DEPP



A: resposta definida como o ΔIIEF; **B:** resposta como o ΔIIEF% (normalizado pelo grau de disfunção erétil antes do tratamento; **C:** score iief após o tratamento**.** Valores expressos como média ± desvio padrão. Devido à frequência do genótipo AA do rs16899974 ser <1% na amostra desta análise, não foi possível analisar os dados deste polimorfismo nos modelos de herança aditivo e recessivo. Teste de Mann Whitney para o modelo dominante e teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para o modelo aditivo

Figura 14 –Associação dos genótipos dos polimorfismos estudados com os três parâmetros da resposta ao Sildenafil – grupo DEC



Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Podemos ver apenas uma associação com significância marginal (P=0.053) do rs16899974 com o ΔIIEF % no modelo dominante. Essas associações foram testadas em modelos de regressão linear multivariada, apresentados nas tabelas 17 e 18

Tabela 17 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de ΔIIEF, ΔIIEF% e IIEF pós-tratamento no grupo DEPP resposta

Modelo		**DEPP (n = 71)**					
		ΔIIEF		**ΔIIEF%**		**IIEF pós Sildenafil**	
		R^2 = 0,11	**RMSE = 0,49**	**R2 = 0,11**	**RMSE = 0,78**	**R^2 = 0,09**	**RMSE = 0,30**
		B	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		+0,010	0,330	+0,015	0,364	+0,006	0,302
Etilismo[a]		-0,059	0,521	-0,083	0,568	-0,025	0,656
Tabagismo							
Fumante		+0,099	0,485	+0,158	0,481	+0,046	0,595
Ex-fumante		-0,077	0,438	-0,134	0,393	-0,039	0,517
Não fumante		-0,022	0,811	-0,024	0,869	-0,007	0,903
Ser diabético		-0,089	0,236	-0,118	0,324	-0,043	0,341
Usar Anti-Hipertensivo(s)		-0,037	0,555	-0,039	0,690	-0,010	0,789
AGXT2							
rs16899974	CC	+0,184	0,308	+0,290	0,311	+0,007	0,950
	CA	+0,189	0,322	+0,299	0,322	+0,017	0,881
	AA	-0,372	0,282	-0,588	0,284	-0,024	0,908
		P Geral = 0,558		**P Geral** = 0,560		**P Geral** = 0,986	
rs37369	CC	+0,068	0,499	+0,076	0,634	+0,001	0,985
	CT	-0,109	0,277	-0,244	0,127	-0,103	0,092
	TT	+0,041	0,779	+0,168	0,470	+0,102	0,255
		P Geral = 0,413		**P Geral** = 0,259		**P Geral** = 0,237	

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de ΔIIEF foram logaritmicamente transformados.

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

Modelo		**DEC (n = 72)**					
		ΔIIEF		**ΔIIEF%**		**IIEF pós Sildenafil**	
		R2 = 0,21	**RMSE = 0,45**	**R2 = 0,19**	**RMSE = 0,74**	**R^2 = 0,24**	**RMSE = 0,29**
		B	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		-0,004	0,555	-0,012	0,230	-0,006	0,088
Etilismo[a]		0,165	0,099	+0,240	0,140	+0,075	0,229
Tabagismo							
Fumante		0,107	0,273	+0,080	0,616	-0,041	0,509
Ex-fumante		-0,065	0,419	-0,073	0,581	+0,031	0,541
Não fumante		-0,042	0,610	-0,007	0,956	+0,010	0,853
Ser diabético		-0,051	0,412	-0,098	0,331	+0,044	0,258
Usar Anti-Hipertensivo(s)		0,033	0,604	+0,035	0,736	-0,024	0,548
AGXT2							
rs16899974	CC	0,273	0,039	+0,420	0,052	+0,065	0,426
	CA	0,080	0,577	+0,111	0,633	-0,081	0,366
	AA	-0,353	0,142	-0,531	0,175	+0,016	0,916
		P Geral = 0,097		**P Geral** = 0,121		**P Geral** = 0,222	
rs37369	CC	-0,076	0,449	-0,038	0,819	-0,013	0,841
	CT	0,203	0,075	+0,317	0,088	+0,105	0,140
	TT	-0,126	0,448	-0,279	0,304	-0,093	0,376
		P Geral = 0,107		**P Geral** = 0,193		**P Geral** = 0,292	

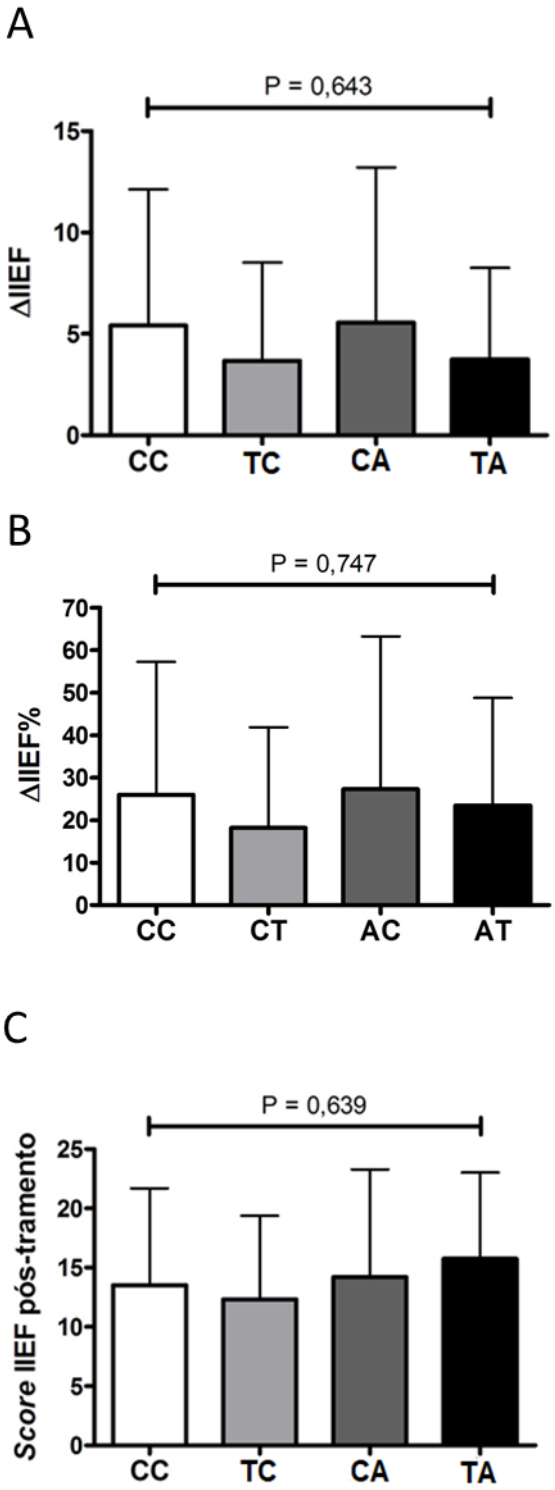
R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de ΔIIEF foram logaritmicamente transformados.

As figuras 15 e 16 mostram o efeito dos haplótipos sobre as formas de resposta ao Sildenafil aqui estudadas nos grupos DEPP e DEC, respectivamente.

Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos. Na figura 16, para a análise do ΔIIEF, há um resultado limítrofe no comparativo com os haplótipos do grupo DEC.

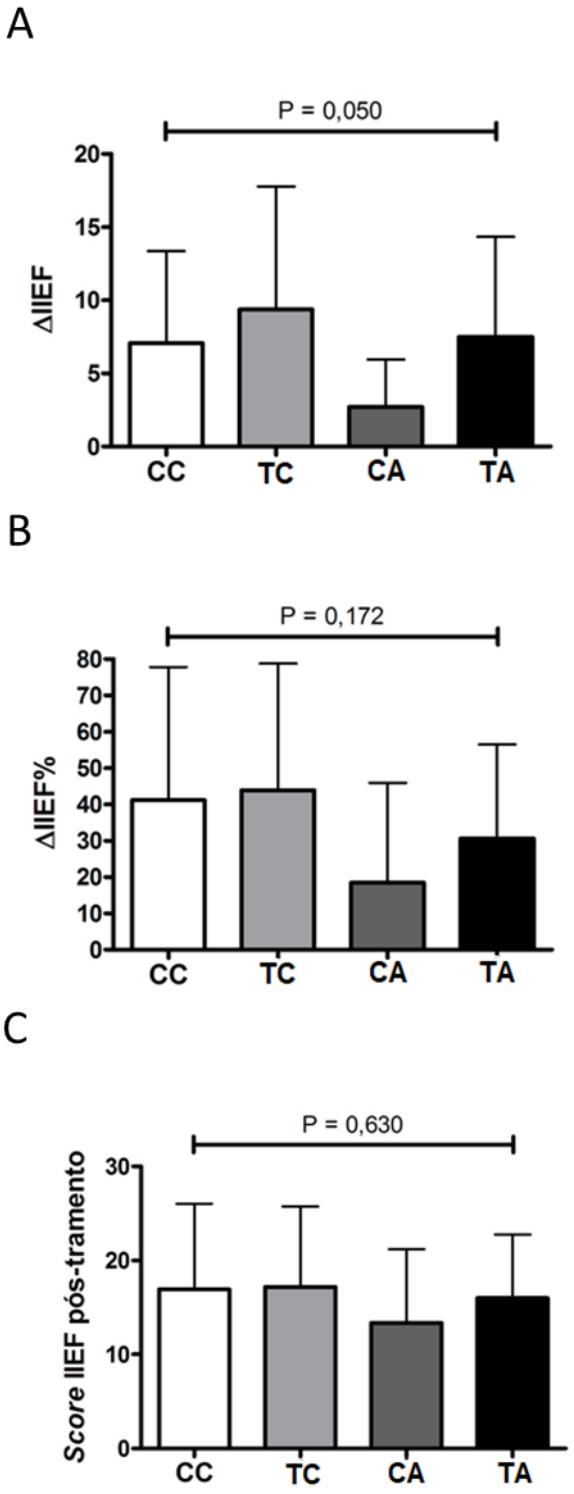
As tabelas 19 e 20 mostram a regressão linear multivariada e os haplótipos e os valores de ΔIIEF, ΔIIEF% e IIEF pós-tratamento nos grupos DEPP e DEC, respectivamente. Estas análises não apresentaram resultados significativos.

Figura 15 –Associação dos Haplótipos dos polimorfismos estudados com os três parâmetros da resposta ao Sildenafil – grupo DEPP



A: resposta definida como o ΔIIEF; **B:** resposta como o ΔIIEF% (normalizado pelo grau de disfunção erétil antes do tratamento; **C:** score iief após o tratamento**.** Valores expressos como média ± desvio padrão. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

Figura 16 –Associação dos Haplótipos dos polimorfismos estudados com os três parâmetros da resposta ao Sildenafil – grupo DEC



A: resposta definida como o ΔIIEF; **B:** resposta como o ΔIIEF% (normalizado pelo grau de disfunção erétil antes do tratamento; **C:** score iief após o tratamento**.** Valores expressos como média ± desvio padrão. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 19 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos Haplótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de ΔIIEF, ΔIIEF% e IIEF pós-tratamento no grupo DEPP resposta

Modelo		**DEPP (n = 142)**					
		ΔIIEF		**ΔIIEF%**		**IIEF pós Sildenafil**	
		R^2 = 0,06	**RMSE = 0,48**	**R^2 = 0,05**	**RMSE = 0,77**	**R^2 = 0,05**	**RMSE = 0,29**
		β	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		0,010	0,145	+0,014	0,195	+0,006	0,124
Etilismo[a]		-0,065	0,304	-0,098	0,331	-0,034	0,377
Tabagismo							
Fumante		0,108	0,270	+0,179	0,252	+0,006	0,124
Ex-fumante		-0,090	0,184	-0,159	0,145	-0,034	0,377
Não fumante		-0,017	0,787	-0,020	0,844	+0,006	0,124
Ser diabético		-0,081	0,115	-0,107	0,195	-0,034	0,377
Usar Anti-Hipertensivo(s)		-0,041	0,331	-0,050	0,452	+0,006	0,124
AGXT2		**P Geral** = 0,790		**P Geral** = 0,798		**P Geral** = 0,820	
Haplótipos	CC	0,047	0,558	+0,040	0,754	-0,022	0,650
	TC	-0,052	0,566	-0,108	0,454	-0,049	0,368
	CA	0,006	0,957	-0,029	0,858	-0,021	0,731
	TA	-0,001	0,997	+0,097	0,742	+0,093	0,407

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de ΔIIEF foram logaritmicamente transformados

Tabela 20 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos Haplótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de ΔIIEF, ΔIIEF% e IIEF pós-tratamento no grupo DEC resposta

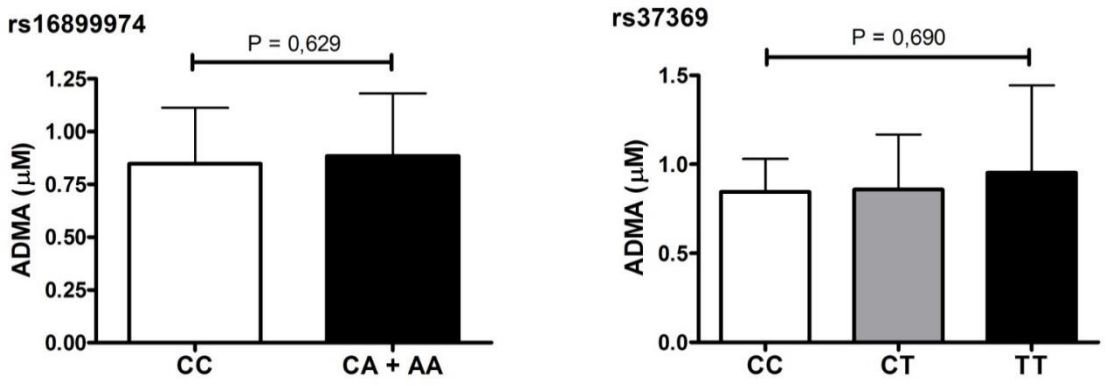
Modelo		**DEC (n = 144)**					
		ΔIIEF		**ΔIIEF%**		**IIEF pós Sildenafil**	
		R^2 = 0,14	**RMSE = 0,45**	**R^2 = 0,14**	**RMSE = 0,73**	**R^2 = 0,18**	**RMSE = 0,28**
		β	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		-0,003	0,452	-0,011	0,082	-0,007	0,004*
Etilismo[a]		+0,161	0,022*	+0,236	0,038*	+0,069	0,043*
Tabagismo							
Fumante		+0,105	0,124	+0,076	0,488	-0,045	0,293
Ex-fumante		-0,073	0,186	-0,082	0,362	+0,041	0,236
Não fumante		-0,031	0,584	+0,006	0,952	+0,004	0,921
Ser diabético		-0,068	0,106	-0,121	0,078	-0,058	0,027*
Usar Anti-Hipertensivo(s)		+0,105	0,124	+0,059	0,402	-0,014	0,599
AGXT2		**P Geral** = 0,101		**P Geral** = 0,193		**P Geral** = 0,468	
Haplótipos	CC	+0,043	0,536	+0,107	0,346	+0,019	0,655
	TC	+0,124	0,202	+0,150	0,342	+0,067	0,271
	CA	-0,252	0,019	-0,339	0,051	-0,090	0,178
	TA	+0,084	0,566	+0,083	0,728	+0,004	0,970

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de ΔIIEF foram logaritmicamente transformados

A figura 17 apresenta os valores de ADMA e os genótipos dos polimorfismos estudados no grupo DEPP.

A tabela 21 apresenta a regressão linear multivariada para os valores de ADMA e os genótipos dos polimorfismos estudados no grupo DEPP. As duas análises não apresentaram resultados significativos.

Figura 17 – ADMA *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo DEPP



Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média ± desvio padrão. Devido à frequência do genótipo AA do rs16899974 ser <1% na amostra desta análise, não foi possível analisar os dados deste polimorfismo nos modelos de herança aditivo e recessivo. Teste T de Student para o modelo dominante e ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o modelo aditivo.

Tabela 21 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de ADMA no grupo DEPP

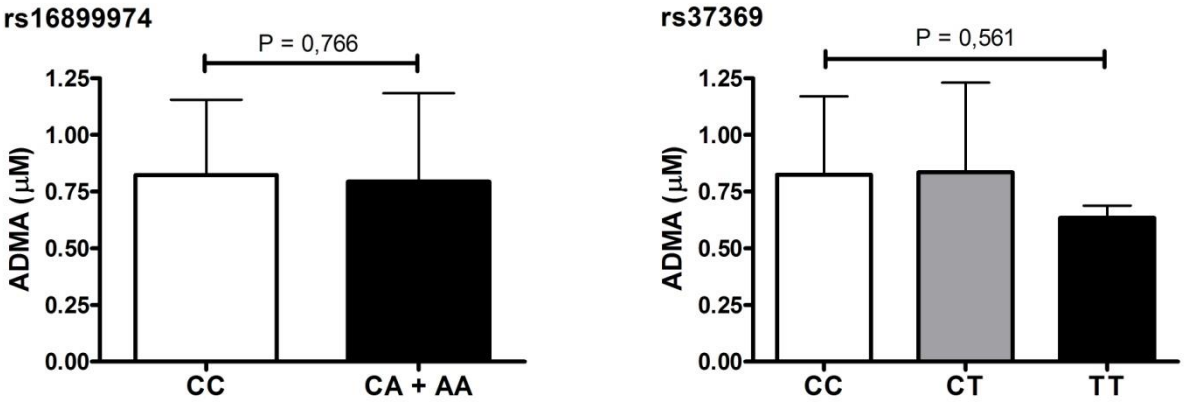
Modelo		DEPP (n = 57)					
		Aditivo		**Dominante**		**Recessivo**	
		R^2 = 0,22		**R^2 = 0,20**		**R^2 = 0,19**	
		RMSE = 0,13		**RMSE = 0,13**		**RMSE = 0,13**	
		β	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		-0,006	0,081	-0,005	0,082	-0,005	0,128
Etilismo[a]		+0,030	0,024*	+0,027	0,254	+0,025	0,293
Tabagismo							
Fumante		-0,082	0,052	-0,081	0,049*	-0,080	0,053
Ex-fumante		+0,077	0,012*	+0,078	0,010*	+0,074	0,014*
Não fumante		+0,004	0,872	+0,003	0,895	+0,007	0,804
Ser diabético		-0,027	0,237	-0,028	0,222	-0,023	0,313
Usar Anti-Hipertensivo(s)		+0,030	0,105	+0,027	0,137	+0,025	0,168
AGXT2							
rs16899974	CC	-0,035	0,466	+0,002	0,921	-0,042	0,528
	CA	-0,047	0,351	-0,002	0,921		
	AA	+0,082	0,366			+0,042	0,528
		P Geral = 0,641					
rs37369	CC	+0,029	0,314	+0,020	0,283	+0,003	0,908
	CT	-0,024	0,402	-0,020	0,283		
	TT	-0,005	0,895			-0,003	0,908
		P Geral = 0,440					

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de nitrito foram logaritmicamente transformados.* P <0,05 significativo.

A figura 18 apresenta os valores de ADMA e os genótipos dos polimorfismos estudados no grupo DEC.

A tabela 22 apresenta a regressão linear multivariada para os valores de ADMA e os genótipos dos polimorfismos estudados no grupo DEC. As duas análises não apresentaram resultados significativos.

Figura 18 – ADMA *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo DEC



Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média ± desvio padrão. Devido à frequência do genótipo AA do rs16899974 ser <1% na amostra desta análise, não foi possível analisar os dados deste polimorfismo nos modelos de herança aditivo e recessivo. Teste T de Student para o modelo dominante e ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o modelo aditivo.

Tabela 22 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de ADMA no grupo DEC resposta

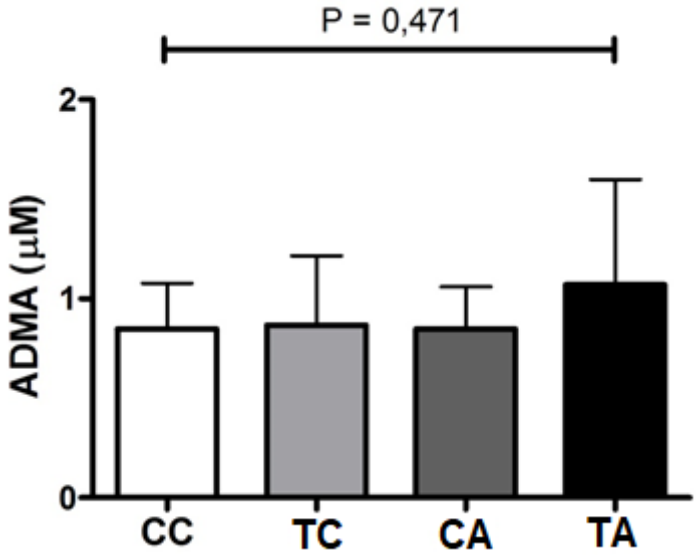
Modelo		DEC (n = 63)					
		Aditivo		**Dominante**		**Recessivo**	
		R^2 = 0,11		**R^2 = 0,07**		**R^2 = 0,10**	
		RMSE = 0,18		**RMSE = 0,18**		**RMSE = 0,18**	
		β	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		+0,000	0,859	+0,001	0,736	+0,001	0,746
Etilismo[a]		+0,059	0,175	+0,068	0,117	+0,060	0,163
Tabagismo							
Fumante		-0,028	0,527	-0,031	0,479	-0,027	0,530
Ex-fumante		-0,010	0,764	-0,009	0,786	-0,011	0,758
Não fumante		+0,038	0,279	+0,040	0,255	+0,038	0,277
Ser diabético		+0,003	0,908	+0,002	0,941	-0,001	0,958
Usar Anti-Hipertensivo(s)		-0,010	0,713	-0,003	0,919	-0,009	0,729
AGXT2							
rs16899974	CC	+0,086	0,238	+0,017	0,533	+0,095	0,330
	CA	+0,054	0,468	-0,017	0,533		
	AA	-0,140	0,306			-0,095	0,330
		P Geral = 0,486					
rs37369	CC	+0,019	0,661	+0,004	0,871	+0,044	0,369
	CT	+0,049	0,315	-0,004	0,871		
	TT	-0,068	0,316			-0,044	0,369
		P Geral = 0,565					

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de nitrito foram logaritmicamente transformados.

A figura 19 apresenta os valores de ADMA e os haplótipos dos polimorfismos estudados no grupo DEPP.

A tabela 23 apresenta a regressão linear multivariada para os valores de ADMA e os haplótipos dos polimorfismos estudados no grupo DEPP. As duas análises não apresentaram resultados significativos.

Figura 19 – ADMA *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo DEPP



Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey

Tabela 23 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de ADMA no grupo DEPP

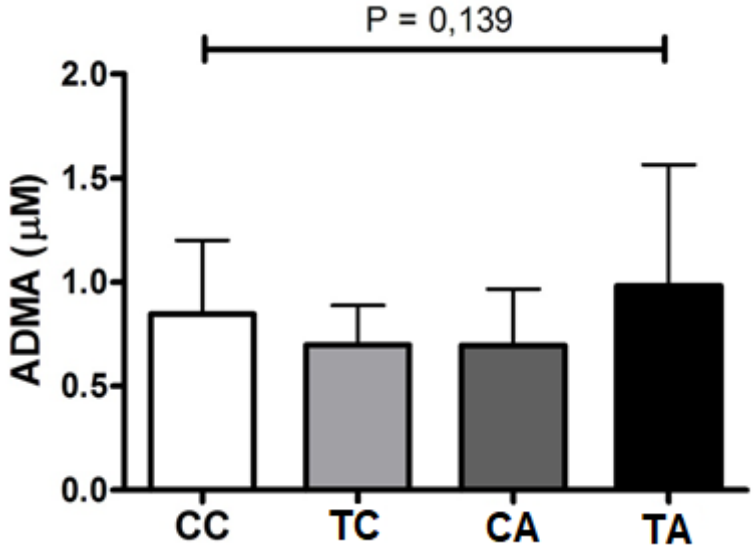
Modelo	**DEPP (n = 114)**	
	R^2 = 0,20	**RMSE = 0,12**
	B	**P**
Idade	-0,005	0,018*
Etilismo[a]	+0,024	0,134
Tabagismo		
Fumante	-0,078	0,005*
Ex-fumante	+0,075	<0,001*
Não fumante	+0,003	0,888
Ser diabético	-0,025	0,106
Usar Anti-Hipertensivo(s)	+0,025	0,039*
AGXT2	**P Geral =** 0,508	
CC	+0,003	0,896
TC	-0,033	0,177
CA	-0,011	0,683
TA	+0,042	0,377

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de ADMA foram logaritmicamente transformados. * P <0,05 significativo.

A figura 20 apresenta os valores de ADMA e os haplótipos dos polimorfismos estudados no grupo DEC.

A tabela 24 apresenta a regressão linear multivariada para os valores de ADMA e os haplótipos dos polimorfismos estudados no grupo DEC. As duas análises não apresentaram resultados significativos.

Figura 20 – ADMA *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo DEC



Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Tabela 24 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de ADMA no grupo DEC

Modelo	**DEC (n = 126)**	
	R^2 = 0,10	**RMSE = 0,17**
	β	**P**
Idade	+0,001	0,506
Etilismo[a]	+0,061	0,038*
Tabagismo		
Fumante	-0,025	0,395
Ex-fumante	-0,016	0,482
Não fumante	+0,041	0,082
Ser diabético	<0,001	0,996
Usar Anti-Hipertensivo(s)	-0,006	0,749
AGXT2	**P Geral =** 0,289	
CC	+0,024	0,415
TC	-0,034	0,409
CA	-0,054	0,217
TA	+0,065	0,296

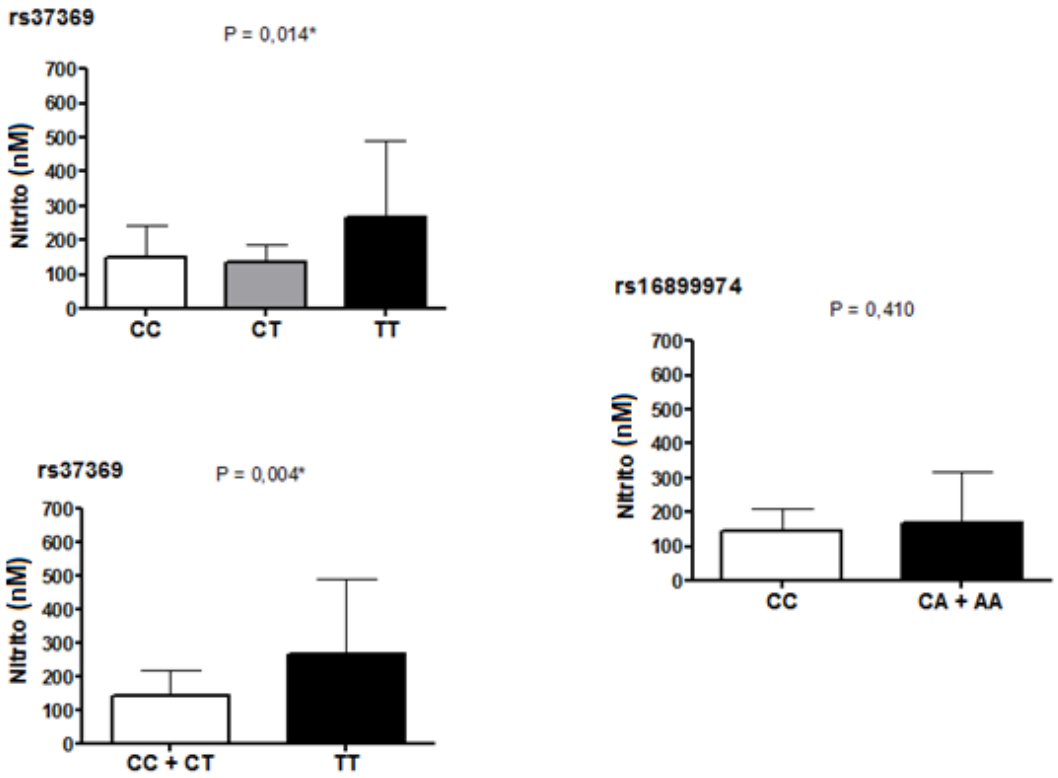
R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de ADMA foram logaritmicamente transformados. * P <0,05 significativo.]

Em seguida, foram feitas as análises para os valores de Nitrito para os polimorfismos estudados.

A figura 21 traz os valores de Nitrito e os genótipos dos polimorfismos estudados, no grupo DEPP. Observa-se resultados significativos nos modelos aditivo e recessivo (P=0,014 e P=0,004, respectivamente) para o polimorfismo rs37369, onde o genótipo TT apresenta maiores níveis de nitrito em comparação aos outros genótipos.

A tabela 25 traz a regressão linear multivariada também mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre as concentrações plasmáticas de nitrito, no grupo DEPP. Confirmando os resultados acima apresentados, para o polimorfismo rs37369, o modelo recessivo desta análise apresenta resultado significativo (P=0,026), confirmando a tendência de associação do genótipo TT a maiores níveis de nitrito. O modelo aditivo, para esta análise, apresenta um resultado muito próximo da significância (P=0,065), mostrando um resultado tendencioso a confirmação da análise não corrigida, que também pode ser um indicativo de associação de maiores níveis de nitrito ao genótipo TT.

Figura 21 – Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo DEPP



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Devido à frequência do genótipo AA do rs16899974 ser <1% na amostra desta análise, não foi possível analisar os dados deste polimorfismo nos modelos de herança aditivo e recessivo. Teste T de Student para os modelos dominante e recessivo e ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o modelo aditivo. * P <0,05 significativo.

Tabela 25 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de nitrito no grupo DEPP resposta

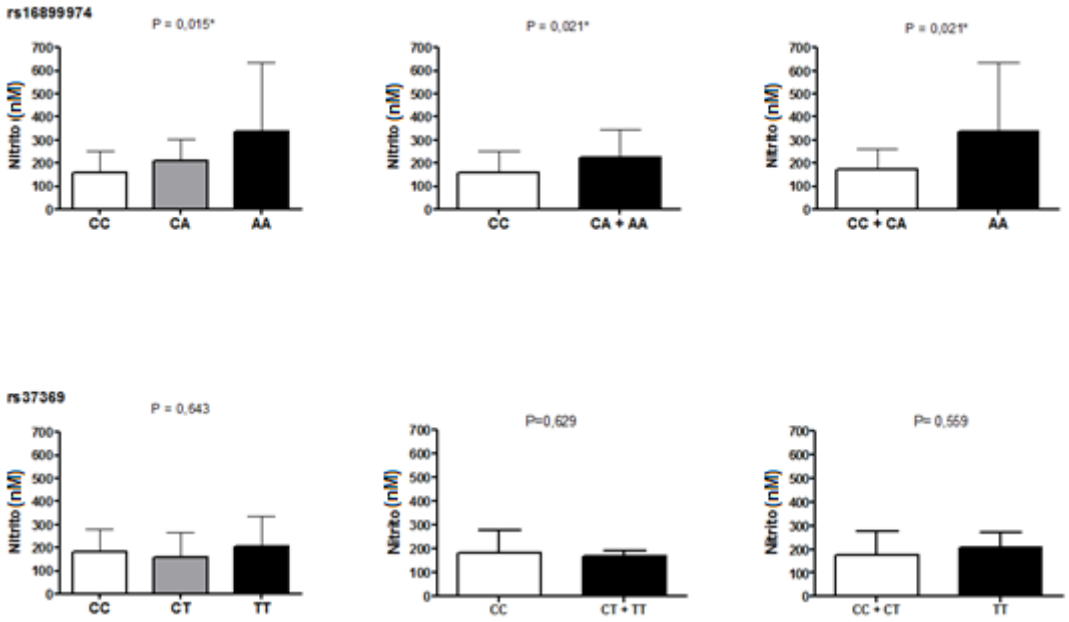
Modelo		DEPP (n = 71)					
		Aditivo		**Dominante**		**Recessivo**	
		R^2 = 0,14		**R^2 = 0,05**		**R^2 = 0,13**	
		RMSE = 0,20		**RMSE = 0,21**		**RMSE = 0,20**	
		β	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		-0,005	0,264	-0,006	0,173	-0,004	0,288
Etilismo[a]		+0,029	0,441	+0,024	0,549	+0,026	0,489
Tabagismo							
Fumante		-0,057	0,333	-0,051	0,409	-0,053	0,366
Ex-fumante		+0,025	0,544	+0,025	0,557	+0,022	0,590
Não fumante		+0,032	0,407	+0,026	0,525	+0,031	0,424
Ser diabético		+0,018	0,572	+0,011	0,744	+0,020	0,507
Usar Anti-Hipertensivo(s)		+0,022	0,398	+0,013	0,631	+0,018	0,483
AGXT2							
rs16899974	CC	-0,056	0,455	-0,006	0,840	-0,086	0,412
	CA	-0,081	0,309				
	AA	+0,137	0,343	+0,006	0,840	+0,086	0,412
		P Geral = 0,593					
rs37369	CC	-0,049	0,246	-0,003	0,914	-0,102	0,026*
	CT	-0,090	0,034	+0,003	0,914		
	TT	+0,139	0,027			+0,102	0,026*
		P Geral = 0,065					

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de nitrito foram logaritmicamente transformados.* P <0,05 significativo.

A figura 22 mostra os níveis de nitrito em relação aos polimorfismos estudados para o grupo DEC. Observa-se, para o polimorfismos rs16899974 uma associação significativa entre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito e os genótipos estudados, nos modelos aditivo, dominante e recessivo (P=0,015, P=0,021 e P=0,021, respectivamente). Os resultados associam o genótipo AA a maiores níveis de nitrito nos modelos aditivo e recessivo e CA+AA no modelo dominante também associado a maiores níveis de nitrito. O polimorfismo rs37369 não apresentou nenhum resultado significativo.

A tabela 26 traz a regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos sobre os valores de nitrito no grupo DEC. Confirmando resultados da análise não corrigida, o modelo aditivo (P=0,029) e o modelo dominante (P=0,024), do polimorfismo rs16899974 associaram os genótipos AA ou CA+AA, respectivamente, a maiores níveis de nitrito. Para o modelo recessivo não houve confirmação com resultado significativo. Também não houve associação significativa para o polimorfismo rs37369.

Figura 22 – Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos estudados – grupo DEC



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de Student para os modelos dominante e recessivo e ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o modelo aditivo.* P <0,05 significativo

Tabela 26 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de nitrito no grupo DEC.

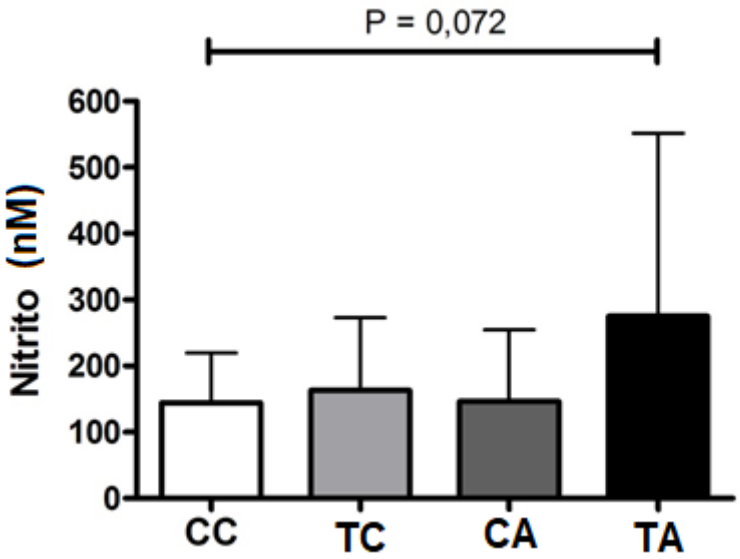
		DEC (n = 72)					
		Aditivo		**Dominante**		**Recessivo**	
Modelo		**R^2 = 0,19**		**R^2 = 0,15**		**R^2 = 0,11**	
		RMSE = 0,22		**RMSE = 0,22**		**RMSE = 0,22**	
		β	**P**	**β**	**P**	**β**	**P**
Idade		+0,001	0,775	+0,001	0,751	<0,001	0,916
Etilismo[a]		-0,015	0,753	-0,022	0,646	-0,008	0,861
Tabagismo							
Fumante		+0,055	0,240	+0,060	0,204	+0,050	0,295
Ex-fumante		-0,004	0,907	-0,005	0,896	-0,001	0,979
Não fumante		-0,050	0,204	-0,055	0,167	-0,049	0,229
Ser diabético		-0,001	0,976	-0,003	0,931	+0,015	0,610
Usar Anti-Hipertensivo(s)		+0,041	0,173	+0,035	0,252	+0,039	0,206
AGXT2							
rs16899974	CC	-0,155	0,014*	-0,070	0,024*	-0,125	0,141
	CA	-0,028	0,683	+0,070	0,024*		
	AA	+0,183	0,109			+0,125	0,141
		P Geral = 0,029*					
rs37369	CC	+0,003	0,957	+0,021	0,475	-0,042	0,485
	CT	-0,087	0,109	-0,021	0,475		
	TT	+0,084	0,289			+0,042	0,485
		P Geral = 0,252					

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de nitrito foram logaritmicamente transformados.* P <0,05 significativo.

A figura 23 apresenta os valores de nitrito vs os haplótipos dos polimorfismos estudados, no grupo DEPP. A Análise apresenta um resultado muito próximo da significância estatística (P=0,072).

A tabela 27 traz resultados da regressão linear multivariada, mostrando o efeito dos haplótipos sobre as concentrações plasmáticas de nitrito. Não apresentou resultado significativo.

Figura 23 – Nitrito *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo DEPP



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey

Tabela 27 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de nitrito no grupo DEPP

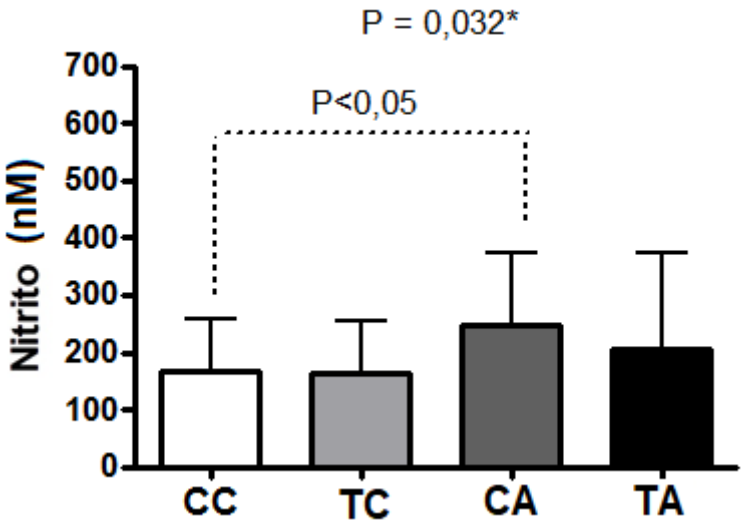
Modelo	**DEPP (n = 142)**	
	R^2 = 0,07	**RMSE = 0,20**
	β	**P**
Idade	-0,005	0,064
Etilismo[a]	+0,021	0,438
Tabagismo		
Fumante	-0,047	0,259
Ex-fumante	+0,023	0,430
Não fumante	+0,024	0,378
Ser diabético	+0,014	0,516
Usar Anti-Hipertensivo(s)	+0,012	0,479
AGXT2	**P Geral =** 0,377	
CC	-0,048	0,157
CT	-0,024	0,525
AC	-0,056	0,203
AT	+0,128	0,103

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de Nitrito foram logaritmicamente transformados.

A figura 24 apresenta os valores de concentração plasmática de nitrito com os haplótipos do grupo DEC. A análise apresentou resultado significativo (P=0,032), onde no comparativo entre os haplótipos CA e os ancestral CC, apresentou P<0,05.

A regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos sobre as concentrações plasmáticas de nitrito nos polimorfismos estudados, mostrado na tabela 28, apresentou um resultado muito próximo à significância estatística (P=0,054), o que leva a crer que os resultados apresentados na análise não corrigida são consistentes.

Figura 24 – Nitrito *vs* haplótipos do gene *AGXT2* – grupo DEC



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.* P <0,05 significativo

Tabela 28 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *AGXT2* sobre os valores de concentração plasmática de nitrito no grupo DEC

Modelo	**DEC (n = 144)**	
	R^2 = 0,13	**RMSE = 0,21**
	β	**P**
Idade	+0,001	0,758
Etilismo[a]	-0,013	0,695
Tabagismo		
Fumante	+0,053	0,102
Ex-fumante	+0,001	0,983
Não fumante	-0,054	0,051
Ser diabético	+0,005	0,804
Usar Anti-Hipertensivo(s)	+0,037	0,078
AGXT2	**P Geral =** 0,054	
CC	-0,053	0,112
TC	-0,057	0,220
CA	+0,116	0,023
TA	-0,006	0,926

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de Nitrito foram logaritmicamente transformado

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os principais achados para este estudo foram

Estudo 1 Caso-Controle:

I. O grupo Pacientes apresentou valor de concentrações plasmáticas de nitrito aumentadas em relação ao grupo Controles.
II. Não houve associação dos parâmetros genéticos com o risco para DE
III. Não houve associação dos polimorfismos estudados com os níveis de nitrito, ADMA, IIEF em pacientes com disfunção erétil.

Estudo 2: Resposta ao Sildenafil

I. Não observamos associações significativas dos genótipos e haplótipos estudados com os três parâmetros de resposta ao Sildenafil.
II. No grupo DEPP o genótipo TT do polimorfismo rs37369 apresentou associação com maiores níveis de Nitrito.
III. No grupo DEC genótipo AA do polimorfismo rs16899974 apresentou associação com maiores níveis de nitrito.
IV. Observamos uma associação do haplótipo AC com maiores níveis plasmáticos de nitrito que o haplótipo ancestral (apenas no DEC).

Disfunção Erétil é definida como a incapacidade de obter e manter uma ereção suficiente para que haja uma atividade sexual satisfatória[2]. Atualmente, o principal tratamento medicamentoso para a DE se baseia na utilização dos inibidores da Fosfodiesterase tipo 5 (iPDE-5), como o Sildenafil [20]. Estima-se que cerca de 80% dos pacientes que fazem o tratamento com os iPDE-5 respondem como o esperado[93], outros, não respondem corretamente ao tratamento, por alguns motivos, como a presença de diabetes, doenças

vasculares, prostatectomia [95; 96; 97]. A não resposta pode acarretar em consequências no tratamento, como o abandono ou, por exemplo, o desenvolvimento ou aumento em possível quadro de depressão e ansiedade [18; 19]. Assim, o estudo de marcadores genéticos que possam afetar a resposta do tratamento com Sildenafil são de grande importância para que futuramente, o tratamento possa se tornar mais eficaz do que o apresentado atualmente.

De acordo com a literatura, a progressão da idade homem é um dos principais fatores relacionados com o desenvolvimento da DE [4; 5]. O avanço da idade também pode ser fator para o desenvolvimento de outras doenças relacionadas ao sistema cardiovascular, como a diabetes e a hipertensão arterial sistêmica. A hipertensão arterial sistêmica e seu tratamento medicamentoso tem sido relacionada também ao desenvolvimento da DE, onde, por exemplo, o tratamento medicamentoso com Metildopa [103], Tiazidas [104], Espironolactona[105] e alguns Beta-Bloqueadores[106], têm como um dos seus efeitos colaterais a diminuição na obtenção e manutenção da ereção, podendo, possivelmente, caracterizar um quadro de DE. Os resultados aqui obtidos entram, em consonância com estes estudos que relacionam a DE com a hipertensão arterial sistêmica e seu tratamento associado.

A diabetes também é um dos fatores associados diretamente ao desenvolvimento da DE. O não tratamento para diabetes já tem, há algum tempo, sido associado ao risco de desenvolvimento de doença arterial periférica, resultando em mudanças no endotélio [107].

Também é válido ressaltar que a causa vasculogênica é um dos principais fatores relacionados ao aparecimento da DE, neste caso, a obstrução da artéria peniana, mediada pela diabetes [91].

Assim como já citado anteriormente, o IIEF é um dos principais instrumentos utilizados para avaliação dos casos de severidade de DE [24]. Os resultados aqui obtidos estão em completo acordo quando inseridos na utilização deste instrumento. O grupo Controles, associados a participantes deste estudo que são considerados saudáveis, obteve uma média de pontuação de 29 no IIEF, no domínio FE, enquanto a média de pontuação para os participantes da pesquisa inseridos no grupo Pacientes, é de 10. Lembrando que para o domínio FE, quanto mais altos os valores no questionário, menor a severidade da DE [108]. Criado e validade por Rosen (1997), o IIEF é um importante instrumento auto aplicável, que possui como finalidade a identificação da severidade dos casos diagnosticados de DE [24]. Além, o seu uso é recomendado pelo 1º consulado internacional de DE [108]. Um dos objetivos para a aplicação deste questionário está relacionado à observação da resposta farmacológica com os inibidores da iPDE-5, possibilitando alterações na farmacoterapia, quando necessárias [24; 25; 109].

A seguir discutiremos os resultados encontrados em face à literatura de forma dividida em três grandes sessões: 1) a associação dos polimorfismos com a função erétil; 2) a associação dos polimorfismos estudados com os níveis de ADMA e 3) a associação dos polimorfismos estudados com o nitrito plasmático.

6.1. Associação dos polimorfismos com a função erétil

O Estudo 1 (caso-controle) não apresentou resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos Controles e Pacientes e resultados obtidos a partir da análise do IIEF, obtendo o que chamamos de *Score* FE.

No estudo de resposta ao Sildenafil, o polimorfismo rs16899974 do grupo DEC apresentou uma tendência para que homens que carregam o genótipo CC para este polimorfismo, possuam maiores valores no ΔIIEF (A regressão linear multivariada,

P=0,097, Tabela 17) e ΔIIEF% (Figura 14, P=0,053). Já em relação ao polimorfismo rs37369, não encontramos associações. Na análise dos haplótipos, Figura 16, encontramos uma associação marginalmente significativa (P=0,050), e pela não significância dos pós-testes, não é possível afirmar se o ΔIIEF dos portadores de um haplótipo é maior que dos portadores de outro haplótipo. Demais parâmetros de resposta (IIEF pós e ΔIIEF%) não tiveram associações significativas com os polimorfismos.

De maneira geral, o grupo DEPP, para ambos os polimorfismos, não apresentou resultados considerados estatisticamente significativos nem na análise de genótipos nem na de haplótipos para nenhuma das três formas de resposta ao Sildenafil.

Estes polimorfismos já foram associados a fenótipos de interesse cardiovascular. Diversas das doenças a seguir compartilham alterações vistas na DE, e seria lógico de se imaginar encontrar aqui resultados análogos às associações reportadas. Ambos SNPs estudados foram associados à maior risco para doença arterial coronariana em egípcios [83]. Além disso, foi demonstrada a associação de ambos polimorfismos com fibrilação atrial e acidente vascular isquêmico em um estudo com número de participantes muito robusto [82]. Nesse estudo foram reunidos participantes de três estudos europeus com populações de alemães, finlandeses e britânicos, totalizando 1834 pacientes e 7159 controles. Esse estudo também reportou associações dos polimorfismos com os níveis circulantes de ADMA e SDMA (comentado mais adiante). O mesmo grupo publicou um grande estudo genômico associando ambos polimorfismos estudados tanto com os níveis de ADMA e SDMA como com a variabilidade da frequência cardíaca em pouco mais de 5 mil participantes finlandeses e alemães [72]. Em japoneses, há relato na literatura da associação entre haplótipo que contém os dois polimorfismos estudados e aumentos na espessura da íntima média de carótida (marcador de aterosclerose)[84]. Nesse estudo, portadores de um haplótipo contendo os dois alelos variantes estudados tinham maior risco de aterosclerose.

Há outros relatos focando mais especificamente o rs37369. Em 2012 esse polimorfismo foi associado à pressão arterial em um grande estudo, onde "apesar de não haver significância genômica", foi observada uma associação do rs37369 com um "modesto aumento " da pressão arterial (P=0.0052) em caucasianos [58].

Em chineses o rs37369 foi associado com maior risco para falência cardíaca [110] e com falência renal nesses pacientes[79]. O que é curioso é que o mesmo genótipo ancestral CC aumentava o risco para falência cardíaca mas protegia a função renal nesses pacientes.

O que é intrigante é que em diversas ocasiões o OR reportado é compatível com o nosso desenho experimental no que tange ao poder amostral calculado. Nós não encontramos associações com risco para DE, nem com gravidade dos sintomas, nem com resposta ao Sildenafil.

É possível que diferenças na estrutura genética entre as populações justifique a ausência da associação aqui. De fato, ao observar as frequências alélicas do rs37369, por exemplo, vemos uma clara inversão da *Minor Allele Frequency* em caucasianos (0.11) e africanos (0.71) (dados do *HapMap* obtidos na base de dados dbSNP - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs37369). Todos os estudos citados acima englobaram populações caucasianas e asiáticas. Nenhum estudo abordou estas associações em africanos. Uma vez que nossa população tem um importante componente de origem africana, isto pode ter impacto em nosso estudo. Mais estudos são necessários tanto para abordar esta hipótese no continente africano como para replicar estes dados em nossa população, que é miscigenada[111]

6.2. Associação dos polimorfismos estudados com os níveis de ADMA

Os valores de ADMA, quando comparados entre grupos portadores dos genótipos dos polimorfismos aqui citados, no grupo Pacientes, não foram diferentes. Ou seja, não houve

associação entre os níveis de ADMA e os polimorfismos estudados em pacientes com disfunção erétil. Nos controles, encontramos uma associação entre o genótipo CC do rs37369 no modelo dominante com maiores níveis de ADMA (P=0,034), confirmado na regressão linear multivariada (P=0.046). Para o polimorfismo rs16899974, não foram encontrados resultados significativos no estudo 1 (caso-controle). No estudo de resposta ao Sildenafil, não foram encontradas associações dos polimorfismos estudados com ADMA.

O alelo T do polimorfismo rs37369 em alguns estudos, tem sido associado a maiores níveis de ADMA e SDMA [82; 83]. Já em relação ao polimorfismo rs16899974, estudos demonstram que o alelo A está associado a maiores níveis de ADMA e SDMA [82; 83]. Alguns estudos já associaram os níveis plasmáticos de ADMA e SDMA à doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial e disfunções endoteliais[54; 55] e biodisponibilidade de NO [56; 58; 73]. Em relação às evidências funcionais, um estudo mostrou que o alelo variante para o rs37369 leva à menor atividade enzimática[73] com o substrato SDMA, o que justifica as associações reportadas na literatura. Tanto as doenças cardiovasculares, quanto o NO possuem importantes papéis para o risco de desenvolvimento ou agravamento no quadro de DE[8; 50; 102; 112]. Assim, esperávamos a priori encontrar uma associação entre os genótipos variantes dos polimorfismos estudados com maiores níveis de ADMA. Existem duas possíveis explicações para a discrepância entre nossos dados e os reportados na literatura. A primeira é que nós não mensuramos o SDMA, e sim o ADMA. Como o ADMA é metabolizado também por outras enzimas (Dimetilarginina dimetilaminohidrolases – DDAH1 e 2), é possível que variações nas atividades dessas outras enzimas tenham confundido as associações entre portadores dos genótipos da *AGXT2* com os níveis dessa substância. De fato, mostramos em estudo aceito para publicação que polimorfismos nos genes *DDAH1 e DDAH2* estão associados aos

níveis de ADMA em pacientes com DE (anexo 4). O segundo motivo é que nós utilizamos um método para dosagem do ADMA por ELISA competitivo. Esse método não é tão preciso como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), usada em muitos dos estudos citados anteriormente. Isto é uma limitação, e devemos ver nossos dados com cautela. Futuros estudos serão desenvolvidos com o método LC-MS e poderemos confirmar os dados reproduzidos aqui.

6.3. Associação dos polimorfismos estudados com o nitrito plasmático

Encontramos em nosso estudo caso-controle uma associação entre os níveis plasmáticos de nitrito com os genótipos do polimorfismo rs16899974 para o grupo Pacientes, onde em um modelo recessivo, os genótipos CC + CA estão associados com menores níveis de nitrito, quando comparados ao genótipo AA (P=0,022). Para este estudo, não foram encontrados outros resultados significativos na comparação entre genótipos e haplótipos e o polimorfismo rs37369.

No segundo estudo de resposta ao Sildenafil, nos pacientes com disfunção erétil de predominantemente de origem vascular (grupo DEC), encontramos uma associação do mesmo polimorfismo rs16899974 com os níveis de nitrito em todos os modelos de herança: aditivo (P=0,015), dominante (P=0,021) e recessivo (P=0,021) (Figura 22). O genótipo AA deste polimorfismo está associado a maiores níveis de nitrito. A Tabela 26, que mostra a regressão linear multivariada para este grupo, avaliando os genótipos do polimorfismo e a concentração plasmática, também apresenta um resultado significativo (P=0,029). Não foram encontradas associações dos níveis de nitrito com o rs37369. Ainda, encontramos uma associação dos haplótipos CC e AC deste mesmo grupo com os níveis de nitrito (P=0,032), onde o haplótipo AC tinha níveis de nitrito aumentados em

relação ao CC. Na regressão multivariada esta associação foi marginalmente significante (P=0,054, tabela 28).

De forma interessante, no grupo pós-prostatectomizado (DEPP), a associação se deu com o outro polimorfismo, o rs37369, e não com o rs16899974. Os modelos de herança aditivo (P=0,014) e recessivo (P=0,004), apresentados na Figura 21 foram significantemente associados aos níveis de nitrito, onde o genótipo TT está associado a maiores níveis de nitrito. Este resultado não é confirmado pela regressão multivariada, apesar desta apresentar um valor de P limítrofe (0,065). A Figura 23 apresenta os resultados de haplótipos para o grupo, também possuindo um resultado quase significativo, com valor limítrofe (P=0,072), não confirmado na regressão multivariada.

O papel do NO está claramente descrito como uma importante molécula no contexto homeostase cardiovascular, em doenças cardiovasculares e também como um importante modulador da DE [30; 31; 39; 40].

Moncada, Epstein e Higgs (1993) trouxeram uma revisão sobre a relação do NO com a L-arginina, trazendo importantes informações, que, ainda hoje, suportam a ideia de que o NO está completamente associado à DE, visto que é uma substância essencial na obtenção da ereção[113]

A redução da biodisponibilidade de NO está associada a disfunção endotelial, além de participar diretamente no contexto cardiovascular, em funções como vasodilatação, agregação plaquetária e em doenças como a aterosclerose [114; 115; 116; 117].

Atuando como principal molécula no processo de obtenção e manutenção da ereção peniana, o NO se faz extremamente necessário. A atuação deste último se dá via GMPc. O processo de detumescência, ou encerramento da ereção ocorre através da enzima PDE-5 [3; 40] que degrada o GMPc. Com a finalidade de melhorar o processo de obtenção e

prolongar a ereção, os iPDE-5, surgem como uma alternativa medicamentosa para o tratamento de tal condição [95].

Alguns estudos na literatura vem procurando associar biomarcadores de risco para DE e para a resposta ao Sildenafil [50; 118; 119]

Aqui investigamos a relação entre polimorfismos importantes para a degradação do ADMA e os níveis de nitrito. A enzima AGXT2 e polimorfismos relacionados estão diretamente ligados à ADMA e SDMA, e, portanto, diretamente conectado com a produção do NO, que é importante para a ereção e a resposta ao Sildenafil (iPDE-5).

O ADMA é uma das formas metiladas da L-Arginina. Essa substância inibe as NO sintases por interagir com o sítio catalítico da enzima não permitindo concomitante entrada do substrato L-Arginina [78]. Seria de se esperar que maiores níveis de ADMA se traduzissem em menores níveis de nitrito e isto resultasse por sua vez em pior função erétil, o que não observamos aqui. Uma das explicações para isto é que a síntese de NO ocorre de forma compartimentalizada no endotélio[114; 115], de tal forma que variações que causem diferenças na produção de NO podem não se refletir de forma sistêmica no plasma. De fato, algumas dessas formas metiladas de L-Arginina, especialmente a SDMA, agem ao inibir o influxo de entrada de L-Arginina nas células endoteliais, causando uma exaustão localizada desse substrato [67; 115]. Assim, mesmo tendo concentrações plasmáticas normais de L-Arginina, esta não está disponível para o endotélio. Ou seja, as concentrações no plasma nem sempre refletem a concentração da substância em contato com as NO sintases. Dessa forma a ausência de associação dos polimorfismos com o ADMA é ainda coerente com a presença da associação dos polimorfismos com os níveis de nitrito, já que é possível que os polimorfismos tenham causado diferenças nas concentrações intracelulares de ADMA afetando a produção de

NO. Estudos realizados anteriormente mostraram que maiores concentrações plasmáticas de nitrito estariam relacionados a piores respostas aos iPDE-5 e que polimorfismos que afetam a biodisponibilidade de NO, mais especificamente em genótipos que apresentam menores concentrações de nitrito, estariam ligados a melhores respostas aos iPDE-5 [100; 101]. Nesse sentido esperávamos que os genótipos TT do polimorfismo rs37369, no grupo DEPP e o genótipo AA do polimorfismo rs16899974, no grupo DEC, estivessem associados com a resposta ao Sildenafil ou até mesmo com o risco para DE, o que não ocorreu.

6.4. Limitações e fortalezas do estudo.

O presente estudo apresenta algumas limitações, por exemplo, o número de participantes desta pesquisa, que pode ser considerado pequeno, principalmente quando comparado a estudos genéticos mais recentes, que possuem um número de participantes relativamente grande (GWAS, por exemplo, tem seu número de participantes em milhares). O ideal é que estudos deste tipo sejam mais ampliados, em diversas condições e populações, permitindo menor probabilidade de deixar de detectar associações de importância clínica. Além disso, a replicação em populações de origem étnica diferente é importante, já que marcadores de risco em determinadas populações podem não representar nada em populações diferentes. O Brasil é considerado como um país miscigenado, portanto, diferentes grupos de pessoas podem ser encontrados. O estudo foi realizado apenas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e arredores, porém, contou com uma população miscigenada, com influência de portugueses, africanos e europeus.

Este estudo apresenta fundamentais e novas condições, que podem ser seguidas em outros estudos, com a finalidade de melhor compreender a influência dos polimorfismos

genéticos da AGXT2, com a DE e seu tratamento associado. Uma das vantagens se trata do delineamento do estudo, que estudou diferentes tipos de condições de grupos, como o estudo de resposta, dividido em DEC, participantes da pesquisa diagnosticados com DE que não passaram por procedimento cirúrgico que possa comprometer a função erétil e DEPP, que são participantes da pesquisa que passaram, há mais de um ano, por uma cirurgia de prostatectomia radical. Além disso, para o estudo de caso-controle, comparamos participantes considerados saudáveis, e participantes diagnosticados com a DE. É válido ressaltar que estudos prévios sobre a DE não fizeram esta distinção de etiologia. Todos os participantes foram avaliados por um questionário comum, o IIEF, que já possui sua eficiência comprovada em diversos estudos, diminuindo a possibilidade de possuir um viés, principalmente nos casos em que a função erétil pós tratamento deve ser avaliada.

Em condições, como a DE, é importante que os grupos sejam delineados de forma criteriosa, para que o estudo, especialmente em se tratando de um estudo genético, não seja realizado de forma errônea. Os fatores de confusão, considerados nas análises estatísticas foram extremamente importantes para que este estudo obtivesse associações em alguns casos, conforme supracitado, os fatores de confusão, como idade, tabagismo, consumo de etanol, diabetes, uso de medicações anti-hipertensivas podem aumentar o risco para desenvolvimento da DE e sua resposta aos iPDE-5.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui apresentados, podemos concluir que:

- O genótipo TT do polimorfismo rs37369 em pacientes do grupo DEPP está associados a maiores níveis de nitrito.
- O genótipo AA do polimorfismo rs16899974 em pacientes do grupo DEC está associado a maiores níveis de nitrito
- Os valores de concentrações de ADMA e o comparativo com o os valores de respostas do IIEF não possuem associações com os polimorfismos estudados.
- Os genótipos estudados não são mais representados em uma população afetada com a disfunção erétil em comparação com uma população saudável.

8. REFERÊNCIAS

[1] ASSOCIATION, A. P. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5. In: (Ed.). **American Psychiatric Association**. 5th. Washington, DC, 2013.

[2] MCCABE, M. P.; ALTHOF, S. E. A systematic review of the psychosocial outcomes associated with erectile dysfunction: does the impact of erectile dysfunction extend beyond a man's inability to have sex? **J Sex Med,** v. 11, n. 2, p. 347-63, Feb 2014. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24251371 >.

[3] MCVARY, K. T. Clinical practice. Erectile dysfunction. **N Engl J Med,** v. 357, n. 24, p. 2472-81, Dec 13 2007. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077811 >.

[4] HALLANZY, J. et al. Erectile Dysfunction in 45-Year-Old Heterosexual German Men and Associated Lifestyle Risk Factors and Comorbidities: Results From the German Male Sex Study. **Sex Med**, Jan 9 2019. ISSN 2050-1161 (Print)

2050-1161 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30638828 >.

[5] ABDO, C. H. et al. [Erectile dysfunction: results of the Brazilian Sexual Life Study]. **Revista da Associacao Medica Brasileira,** v. 52, n. 6, p. 424-9, Nov-Dec 2006. ISSN 0104-4230 (Print)

0104-4230 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17242780 >.

[6] LEWIS, R. W. Epidemiology of sexual dysfunction in Asia compared to the rest of the world. **Asian journal of andrology,** v. 13, n. 1, p. 152-8, Jan 2011. ISSN 1745-7262 (Electronic)

1008-682X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076440 >.

[7] LEWIS, R. W. et al. Dihydropyrimidinone positive modulation of delta-subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors, including an epilepsy-linked mutant variant. **Biochemistry,** v. 49, n. 23, p. 4841-51, Jun 15 2010. ISSN 1520-4995 (Electronic)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450160 >.

[8] COLSON, M. H. et al. [Erectile dysfunction : up-date data and clinical guidelines]. **Revue medicale suisse,** v. 15, n. 642, p. 583-589, Mar 13 2019. ISSN 1660-9379 (Print)

1660-9379 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30865391 >.

[9] FELDMAN, H. A. et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. **The Journal of urology,** v. 151, n. 1, p. 54-61, Jan 1994. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254833 >.

[10] QUILTER, M. et al. Male Sexual Function in New Zealand: A Population-Based Cross-Sectional Survey of the Prevalence of Erectile Dysfunction in Men Aged 40-70 Years. **The journal of sexual medicine,** v. 14, n. 7, p. 928-936, Jul 2017. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28673435 >.

[11] AYTA, I. A.; MCKINLAY, J. B.; KRANE, R. J. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **BJU international,** v. 84, n. 1, p. 50-6, Jul 1999. ISSN 1464-4096 (Print)

1464-4096 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444124 >.

[12] JACKSON, G. Treatment of erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease : guide to drug selection. **Drugs,** v. 64, n. 14, p. 1533-45, 2004. ISSN 0012-6667 (Print)

0012-6667 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233591 >.

[13] EARDLEY, I. Imaging for erectile dysfunction. **Current opinion in urology,** v. 12, n. 2, p. 143-7, Mar 2002. ISSN 1473-6586 (Electronic)

0963-0643 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859262 >.

[14] JACKSON, G. et al. The second Princeton consensus on sexual dysfunction and cardiac risk: new guidelines for sexual medicine. **The journal of sexual medicine,** v. 3, n. 1, p. 28-36; discussion 36, Jan 2006. ISSN 1743-6095 (Print)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409215 >.

[15] VARDI, Y. Microvascular complications in diabetic erectile dysfunction: do we need other alternatives? **Diabetes Care,** v. 32 Suppl 2, p. S420-2, Nov 2009. ISSN 1935-5548 (Electronic)

0149-5992 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875592 >.

[16] LEIGH, B. C.; TEMPLE, M. T.; TROCKI, K. F. The sexual behavior of US adults: results from a national survey. **American journal of public health,** v. 83, n. 10, p. 1400-8, Oct 1993. ISSN 0090-0036 (Print)

0090-0036 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8214228 >.

[17] RAMPIN, O.; GIULIANO, F. Central control of the cardiovascular and erection systems: possible mechanisms and interactions. **The American journal of cardiology,** v. 86, n. 2A, p. 19F-22F, Jul 20 2000. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899272 >.

[18] FRIEDMAN, S. Cardiac disease, anxiety, and sexual functioning. **The American journal of cardiology,** v. 86, n. 2A, p. 46F-50F, Jul 20 2000. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899279 >.

[19] FRANK, E.; ANDERSON, C.; RUBINSTEIN, D. Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. **The New England journal of medicine,** v. 299, n. 3, p. 111-5, Jul 20 1978. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/661870 >.

[20] LORAN, O. B. et al. Sildenafil citrate 100 mg starting dose in men with erectile dysfunction in an international, double-blind, placebo-controlled study: effect on the sexual experience and reducing feelings of anxiety about the next intercourse attempt. **The journal of sexual medicine,** v. 6, n. 10, p. 2826-35, Oct 2009. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19817982 >.

[21] BRINDLEY, G. S. Cavernosal alpha-blockade: a new technique for investigating and treating erectile impotence. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science,** v. 143, p. 332-7, Oct 1983. ISSN 0007-1250 (Print)

0007-1250 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6626852 >.

[22] PADMA-NATHAN, H. Urology: new developments in diagnosing and treating erectile impotence. **The Western journal of medicine,** v. 147, n. 2, p. 187, Aug 1987. ISSN 0093-0415 (Print)

0093-0415 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18750295 >.

[23] FROHRIB, D. A. et al. Characterization of penile erectile states using external computer-based monitoring. **Journal of biomechanical engineering,** v. 109, n. 2, p. 110-4, May 1987. ISSN 0148-0731 (Print)

0148-0731 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3599934 >.

[24] 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. ISSN 0090-4295 (Print)

0090-4295 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187685 >.

[25] 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. ISSN 1527-9995 (Electronic)

0090-4295 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10443736 >.

[26] GONZALES, A. I. et al. Validation of the International Index of Erectile Function (IIFE) for use in Brazil. **Arquivos brasileiros de cardiologia,** v. 101, n. 2, p. 176-82, Aug 2013. ISSN 1678-4170 (Electronic)

0066-782X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842798 >.

[27] SATTAR, A. A.; WESPES, E.; SCHULMAN, C. C. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. **European urology,** v. 25, n. 2, p. 142-4, 1994. ISSN 0302-2838 (Print)

0302-2838 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137855 >.

[28] BROCK, G. et al. The anatomy of the tunica albuginea in the normal penis and Peyronie's disease. **The Journal of urology,** v. 157, n. 1, p. 276-81, Jan 1997. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8976279 >.

[29] MCKENNA, K. E. Central control of penile erection. **International journal of impotence research,** v. 10 Suppl 1, p. S25-34, May 1998. ISSN 0955-9930 (Print)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9669218 >.

[30] TODA, N.; OKAMURA, T. Possible role of nitric oxide in transmitting information from vasodilator nerve to cerebroarterial muscle. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 170, n. 1, p. 308-13, Jul 16 1990. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2164808 >.

[31] _____. Mechanism underlying the response to vasodilator nerve stimulation in isolated dog and monkey cerebral arteries. **The American journal of physiology,** v. 259, n. 5 Pt 2, p. H1511-7, Nov 1990. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1700632 >.

[32] LEE, Y. C. et al. The associations among eNOS G894T gene polymorphism, erectile dysfunction and related risk factors. **BJU international,** v. 100, n. 5, p. 1116-20, Nov 2007. ISSN 1464-4096 (Print)

1464-4096 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868426 >.

[33] MIZUSAWA, H. et al. Nitric oxide independent activation of guanylate cyclase by YC-1 causes erectile responses in the rat. **The Journal of urology,** v. 167, n. 5, p. 2276-81, May 2002. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956492 >.

[34] LUNDBERG, J. M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. **Pharmacological reviews,** v. 48, n. 1, p. 113-78, Mar 1996. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8685245 >.

[35] WIKLUND, N. P. et al. Release of nitric oxide evoked by nerve stimulation in guinea-pig intestine. **Neuroscience,** v. 53, n. 3, p. 607-11, Apr 1993. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683776 >.

[36] BUSH, P. A.; GONZALEZ, N. E.; IGNARRO, L. J. Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 186, n. 1, p. 308-14, Jul 15 1992. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378725 >.

[37] IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation research,** v. 61, n. 6, p. 866-79, Dec 1987. ISSN 0009-7330 (Print)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2890446 >.

[38] 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. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652836 >.

[39] BIVALACQUA, T. J. et al. Nitric oxide-mediated erectile effects of galantide but not galanin in vivo. **Nitric oxide : biology and chemistry,** v. 4, n. 2, p. 94-102, Apr 2000. ISSN 1089-8603 (Print)

1089-8603 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835289 >.

[40] LACCHINI, R.; TANUS-SANTOS, J. E. Pharmacogenetics of erectile dysfunction: navigating into uncharted waters. **Pharmacogenomics,** v. 15, n. 11, p. 1519-38, Aug 2014. ISSN 1744-8042 (Electronic)

1462-2416 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25303302 >.

[41] PALIT, V.; EARDLEY, I. An update on new oral PDE5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction. **Nature reviews. Urology,** v. 7, n. 11, p. 603-9, Nov 2010. ISSN 1759-4820 (Electronic)

1759-4812 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068761 >.

[42] KIFOR, I. et al. Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. **The Journal of urology,** v. 157, n. 5, p. 1920-5, May 1997. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9112563 >.

[43] COMITER, C. V. et al. Effect of angiotensin II on corpus cavernosum smooth muscle in relation to nitric oxide environment: in vitro studies in canines. **International journal of impotence research,** v. 9, n. 3, p. 135-40, Sep 1997. ISSN 0955-9930 (Print)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9315490 >.

[44] ODISHO, A. Y.; HAMPSON, L. A.; LUE, T. F. Innovative surgical techniques for managing Peyronie's disease: a video presentation. **Translational andrology and urology,** v. 2, n. 4, p. 312-5, Dec 2013. ISSN 2223-4691 (Print)

2223-4683 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816744 >.

[45] GUIRADO, G. N. et al. Combined exercise training in asymptomatic elderly with controlled hypertension: effects on functional capacity and cardiac diastolic function. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research,** v. 18, n. 7, p. CR461-5, Jul 2012. ISSN 1643-3750 (Electronic)

1234-1010 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739737 >.

[46] PERTICONE, F. et al. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. **Journal of the American College of Cardiology,** v. 46, n. 3, p. 518-23, Aug 2 2005. ISSN 0735-1097 (Print)

0735-1097 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16053968 >.

[47] ROMERO, J. C.; RECKELHOFF, J. F. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. **Hypertension,** v. 34, n. 4 Pt 2, p. 943-9, Oct 1999. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523389 >.

[48] GORE, M. O. et al. Symmetrical dimethylarginine predicts mortality in the general population: observations from the Dallas heart study. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology,** v. 33, n. 11, p. 2682-8, Nov 2013. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24008162 >.

[49] LUNEBURG, N. et al. Symmetric dimethylarginine is a marker of detrimental outcome in the acute phase after ischaemic stroke: role of renal function. **Clinical science,** v. 122, n. 3, p. 105-11, Feb 2012. ISSN 1470-8736 (Electronic)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777201 >.

[50] BURNETT, A. L. et al. Nitric oxide/redox-based signalling as a therapeutic target for penile disorders. **Expert opinion on therapeutic targets,** v. 10, n. 3, p. 445-57, Jun 2006. ISSN 1744-7631 (Electronic)

1472-8222 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16706684 >.

[51] TAIN, Y. L. et al. Melatonin prevents hypertension and increased asymmetric dimethylarginine in young spontaneous hypertensive rats. **Journal of pineal research,** v. 49, n. 4, p. 390-8, Nov 2010. ISSN 1600-079X (Electronic)

0742-3098 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950359 >.

[52] BOURAS, G. et al. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? **Current topics in medicinal chemistry,** v. 13, n. 2, p. 180-200, 2013. ISSN 1873-4294 (Electronic)

1568-0266 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470077 >.

[53] SYDOW, K. et al. Distribution of asymmetric dimethylarginine among 980 healthy, older adults of different ethnicities. **Clinical chemistry,** v. 56, n. 1, p. 111-20, Jan 2010. ISSN 1530-8561 (Electronic)

0009-9147 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892843 >.

[54] SIBAL, L. et al. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. **Current cardiology reviews,** v. 6, n. 2, p. 82-90, May 2010. ISSN 1875-6557 (Electronic)

1573-403X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532773 >.

[55] PERTICONE, F. et al. Endothelial dysfunction, ADMA and insulin resistance in essential hypertension. **International journal of cardiology,** v. 142, n. 3, p. 236-41, Jul 23 2010. ISSN 1874-1754 (Electronic)

0167-5273 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168237 >.

[56] WILCKEN, D. E. et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. **Molecular**

genetics and metabolism, v. 91, n. 4, p. 309-17; discussion 308, Aug 2007. ISSN 1096-7192 (Print)

1096-7192 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17560156 >.

[57] CARDOUNEL, A. J. et al. Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. **The Journal of biological chemistry,** v. 282, n. 2, p. 879-87, Jan 12 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082183 >.

[58] CAPLIN, B. et al. Alanine-glyoxylate aminotransferase-2 metabolizes endogenous methylarginines, regulates NO, and controls blood pressure. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology,** v. 32, n. 12, p. 2892-900, Dec 2012. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023372 >.

[59] SUHRE, K. et al. A genome-wide association study of metabolic traits in human urine. **Nature genetics,** v. 43, n. 6, p. 565-9, Jun 2011. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572414 >.

[60] TOJO, A. et al. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. **Kidney international,** v. 52, n. 6, p. 1593-601, Dec 1997. ISSN 0085-2538 (Print)

0085-2538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407505 >.

[61] SIEGERINK, B. et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginine and risk of secondary cardiovascular disease events and mortality in patients with stable coronary heart disease: the KAROLA follow-up study. **Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society,** v. 102, n. 3, p. 193-202, Mar 2013. ISSN 1861-0692 (Electronic)

1861-0684 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073705 >.

[62] MEINITZER, A. et al. Symmetrical and asymmetrical dimethylarginine as predictors for mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. **Clinical chemistry,** v. 57, n. 1, p. 112-21, Jan 2011. ISSN 1530-8561 (Electronic)

0009-9147 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21036946 >.

[63] KIECHL, S. et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. **Atherosclerosis,** v. 205, n. 1, p. 261-5, Jul 2009. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100547 >.

64 BUSCH, M. et al. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease - possible candidates for paradoxical epidemiology? **Amino acids,** v. 30, n. 3, p. 225-32, May 2006. ISSN 0939-4451 (Print)

0939-4451 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680555 >.

65 SCHEPERS, E. et al. Dimethylarginines ADMA and SDMA: the real water-soluble small toxins? **Seminars in nephrology,** v. 34, n. 2, p. 97-105, Mar 2014. ISSN 1558-4488 (Electronic)

0270-9295 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780466 >.

66 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. **International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association,** v. 15, n. 2, p. 128-34, Feb 2008. ISSN 1442-2042 (Electronic)

0919-8172 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18269446 >.

67 KITTEL, A. et al. In vivo evidence that Agxt2 can regulate plasma levels of dimethylarginines in mice. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 430, n. 1, p. 84-9, Jan 4 2013. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23154179 >.

68 RODIONOV, R. N. et al. AGXT2: a promiscuous aminotransferase. **Trends in pharmacological sciences,** v. 35, n. 11, p. 575-82, Nov 2014. ISSN 1873-3735 (Electronic)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25294000 >.

69 LEE, I. S. et al. Specific expression of alanine-glyoxylate aminotransferase 2 in the epithelial cells of Henle's loop. **Nephron,** v. 83, n. 2, p. 184-5, 1999. ISSN 1660-8151 (Print)

1660-8151 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516509 >.

70 RODIONOV, R. N. et al. Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production. **The Journal of biological chemistry,** v. 285, n. 8, p. 5385-91, Feb 19 2010. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018850 >.

[71] ZHOU, J. P. et al. Association of the AGXT2 V140I polymorphism with risk for coronary heart disease in a Chinese population. **Journal of atherosclerosis and thrombosis,** v. 21, n. 10, p. 1022-30, 2014. ISSN 1880-3873 (Electronic)

1340-3478 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834905 >.

[72] SEPPALA, I. et al. Genome-wide association study on dimethylarginines reveals novel AGXT2 variants associated with heart rate variability but not with overall mortality. **European heart journal,** v. 35, n. 8, p. 524-31, Feb 2014. ISSN 1522-9645 (Electronic)

0195-668X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24159190 >.

[73] KITTEL, A. et al. Alanine-glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2) polymorphisms have considerable impact on methylarginine and beta-aminoisobutyrate metabolism in healthy volunteers. **PLoS One,** v. 9, n. 2, p. e88544, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586340 >.

[74] RHEE, E. P. et al. A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort. **Cell metabolism,** v. 18, n. 1, p. 130-43, Jul 2 2013. ISSN 1932-7420 (Electronic)

1550-4131 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23823483 >.

[75] NICHOLSON, G. et al. A genome-wide metabolic QTL analysis in Europeans implicates two loci shaped by recent positive selection. **PLoS genetics,** v. 7, n. 9, p. e1002270, Sep 2011. ISSN 1553-7404 (Electronic)

1553-7390 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21931564 >.

[76] PARONI, R. et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and L-arginine in patients with arteriogenic and non-arteriogenic erectile dysfunction. **International journal of andrology,** v. 35, n. 5, p. 660-7, Oct 2012. ISSN 1365-2605 (Electronic)

0105-6263 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22519580 >.

[77] 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. ISSN 1532-7361 (Electronic)

0039-6060 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962167 >.

[78] LUNEBURG, N. et al. Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine. **Circulation. Cardiovascular genetics,** v. 7, n. 6, p. 864-72, Dec 2014. ISSN 1942-3268 (Electronic)

1942-3268 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25245031 >.

[79] HU, X. L. et al. AGXT2 rs37369 polymorphism predicts the renal function in patients with chronic heart failure. **Gene,** v. 637, p. 145-151, Dec 30 2017. ISSN 1879-0038 (Electronic)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28942034 >.

[80] HU, X. L. et al. AGXT2: An unnegligible aminotransferase in cardiovascular and urinary systems. **Journal of molecular and cellular cardiology,** v. 113, p. 33-38, Dec 2017. ISSN 1095-8584 (Electronic)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28970090 >.

[81] AU YEUNG, S. L. et al. Effect of l-arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine on ischemic heart disease risk: A Mendelian randomization study. **American heart journal,** v. 182, p. 54-61, Dec 2016. ISSN 1097-6744 (Electronic)

0002-8703 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27914500 >.

[82] SEPPALA, I. et al. Associations of functional alanine-glyoxylate aminotransferase 2 gene variants with atrial fibrillation and ischemic stroke. **Scientific Reports,** v. 6, p. 23207, Mar 17 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984639 >.

[83] AMIR, M. et al. AGXT2 and DDAH-1 genetic variants are highly correlated with serum ADMA and SDMA levels and with incidence of coronary artery disease in Egyptians. **Molecular biology reports,** v. 45, n. 6, p. 2411-2419, Dec 2018. ISSN 1573-4978 (Electronic)

0301-4851 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30284143 >.

[84] YOSHINO, Y. et al. Missense variants of the alanine: glyoxylate aminotransferase 2 gene correlated with carotid atherosclerosis in the Japanese population. **Journal of biological regulators and homeostatic agents,** v. 28, n. 4, p. 605-14, Oct-Dec 2014. ISSN 0393-974X (Print)

0393-974X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25620171 >.

[85] 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. ISSN 1942-3268 (Electronic)

1942-3268 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25245031 >.

[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. ISSN 1524-4636 (Electronic)

1079-5642 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023372 >.

[87] 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. ISSN 1880-3873 (Electronic)

1340-3478 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834905 >.

[88] 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. ISSN 1522-9645 (Electronic)

0195-668X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24159190 >.

[89] MANNINO, D. M.; KLEVENS, R. M.; FLANDERS, W. D. Cigarette smoking: an independent risk factor for impotence? **American journal of epidemiology,** v. 140, n. 11, p. 1003-8, Dec 1 1994. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7985647 >.

[90] BACON, C. G. et al. Sexual function in men older than 50 years of age: results from the health professionals follow-up study. **Annals of internal medicine,** v. 139, n. 3, p. 161-8, Aug 5 2003. ISSN 1539-3704 (Electronic)

0003-4819 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12899583 >.

[91] DEAN, R. C.; LUE, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urologic Clinics of North America,** v. 32, n. 4, p. 379-+, Nov 2005. ISSN 0094-0143. Disponível em: < <Go to ISI>://000233765700003 >.

[92] GRATZKE, C. et al. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Sex Med,** v. 7, n. 1 Pt 2, p. 445-75, Jan 2010. ISSN 1743-6109 (Electronic)

1743-6095 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092448 >.

[93] SHINLAPAWITTAYATORN, K.; CHATTIPAKORN, S.; CHATTIPAKORN, N. Effect of sildenafil citrate on the cardiovascular system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 38, n. 9, p. 1303-1311, Sep 2005. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <Go to ISI>://000231773600003 >.

[94] MUKHERJEE, B.; SHIVAKUMAR, T. A case of sensorineural deafness following ingestion of sildenafil. **Journal of Laryngology and Otology,** v. 121, n. 4, p. 395-397, Apr 2007. ISSN 0022-2151. Disponível em: < <Go to ISI>://000250484700022 >.

[95] SMITH, W. B., 2ND et al. PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence. **International journal of clinical practice,** v. 67, n. 8, p. 768-80, Aug 2013. ISSN 1742-1241 (Electronic)

1368-5031 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869678 >.

[96] 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. ISSN 0098-7484 (Print)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9952201 >.

[97] HONG, E. K.; LEPOR, H.; MCCULLOUGH, A. R. Time dependent patient satisfaction with sildenafil for erectile dysfunction (ED) after nerve-sparing radical retropubic prostatectomy (RRP). **International journal of impotence research,** v. 11 Suppl 1, p. S15-22, Sep 1999. ISSN 0955-9930 (Print)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10554925 >.

[98] TURNER, L. A. et al. Self-injection of papaverine and phentolamine in the treatment of psychogenic impotence. **Journal of sex & marital therapy,** v. 15, n. 3, p. 163-76, Fall 1989. ISSN 0092-623X (Print)

0092-623X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2593154 >.

[99] CLARO, J. A. et al. Effect of sildenafil in cavernous arteries of patients with erectile dysfunction. **International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology,** v. 29, n. 4, p. 320-6, Jul-Aug 2003. ISSN 1677-5538 (Print)

1677-5538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15745555 >.

[100] 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. ISSN 1744-8042 (Electronic)

1462-2416 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24897285 >.

[101] MUNIZ, J. J. et al. Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. **The pharmacogenomics journal,** v. 13, n. 2, p. 189-96, Apr 2013. ISSN 1473-1150 (Electronic)

1470-269X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064666 >.

[102] MUNIZ, J. J. et al. Low nitric oxide bioavailability is associated with better responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology,** v. 386, n. 9, p. 805-11, Sep 2013. ISSN 1432-1912 (Electronic)

0028-1298 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685845 >.

[103] CROOG, S. H. et al. Sexual symptoms in hypertensive patients. A clinical trial of antihypertensive medications. **Archives of internal medicine,** v. 148, n. 4, p. 788-94, Apr 1988. ISSN 0003-9926 (Print)

0003-9926 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3281619 >.

[104] CHANG, S. W. et al. The impact of diuretic therapy on reported sexual function. **Archives of internal medicine,** v. 151, n. 12, p. 2402-8, Dec 1991. ISSN 0003-9926 (Print)

0003-9926 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1746997 >.

[105] SPARK, R. F.; MELBY, J. C. Aldosteronism in hypertension. The spironolactone response test. **Annals of internal medicine,** v. 69, n. 4, p. 685-91, Oct 1968. ISSN 0003-4819 (Print)

0003-4819 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5682243 >.

[106] SMITH, P. J.; TALBERT, R. L. Sexual dysfunction with antihypertensive and antipsychotic agents. **Clinical pharmacy,** v. 5, n. 5, p. 373-84, May 1986. ISSN 0278-2677 (Print)

0278-2677 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2872991 >.

[107] ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **The New England journal of medicine,** v. 340, n. 2, p. 115-26, Jan 14 1999. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887164 >.

[108] ROSEN, R. C.; CAPPELLERI, J. C.; GENDRANO, N., 3RD. The International Index of Erectile Function (IIEF): a state-of-the-science review. **International journal of impotence research,** v. 14, n. 4, p. 226-44, Aug 2002. ISSN 0955-9930 (Print)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12152111 >.

[109] CAPPELLERI, J. C. et al. Relationship between patient self-assessment of erectile function and the erectile function domain of the international index of erectile function. **Urology,** v. 56, n. 3, p. 477-81, Sep 1 2000. ISSN 1527-9995 (Electronic)

0090-4295 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962319 >.

[110] HU, X. L. et al. Considerable impacts of AGXT2 V140I polymorphism on chronic heart failure in the Chinese population. **Atherosclerosis,** v. 251, p. 255-262, Aug 2016. ISSN 1879-1484 (Electronic)

0021-9150 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27423328 >.

[111] PENA, S. D. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One,** v. 6, n. 2, p. e17063, Feb 16 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359226 >.

[112] PARK, K. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rat penile tissue: reduced enzyme activity is responsible for erectile dysfunction in a rat model of atherosclerosis. **International journal of impotence research,** v. 21, n. 4, p. 228-34, Jul-Aug 2009. ISSN 1476-5489 (Electronic)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19603041 >.

[113] MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England journal of medicine,** v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504210 >.

[114] APOSTOLI, G. L. et al. Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-cGMP-mediated inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH,** v. 12, n. 11, p. 1880-9, Nov 2014. ISSN 1538-7836 (Electronic)

1538-7836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25163536 >.

[115] LOSCALZO, J. The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. **Circulation research,** v. 113, n. 2, p. 100-3, Jul 5 2013. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23833290 >.

[116] SITIA, S. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. **Autoimmunity reviews,** v. 9, n. 12, p. 830-4, Oct 2010. ISSN 1873-0183 (Electronic)

1568-9972 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20678595 >.

[117] ZIMMET, J. M.; HARE, J. M. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. **Circulation,** v. 114, n. 14, p. 1531-44, Oct 3 2006. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015805 >.

[118] EISENHARDT, A. et al. Genetic association study of the GNB3 C825T, the ACE I/D and the eNOS G894T polymorphisms and the risk to develop erectile dysfunction in a German ED population. **Andrologia,** v. 42, n. 4, p. 218-24, Aug 2010. ISSN 1439-0272 (Electronic)

0303-4569 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629643 >.

[119] EISENHARDT, A. et al. ACE gene I/D and NOS3 G894T polymorphisms and response to sildenafil in men with erectile dysfunction. **Urology,** v. 62, n. 1, p. 152-7, Jul 2003. ISSN 1527-9995 (Electronic)

0090-4295 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12837457 >.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo cujos detalhes são:

1) Este projeto pretende estudar algumas variações comuns de alguns dos seus genes (que transmitem características hereditárias) que podem estar associadas a uma vulnerabilidade natural à disfunção erétil e podem alterar o sucesso do tratamento. Além disso, pretendemos estudar como estas variações podem modificar as quantidades de algumas substâncias produzidas pelo seu organismo presentes no seu sangue. Isto poderá nos auxiliar no entendimento da disfunção erétil. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), que tem como finalidade proteger eticamente os participantes de pesquisas.

2) Sua participação neste estudo consistirá em: serão retirados 30 mL do seu sangue por punção venosa utilizando técnica adequada. Este volume de sangue é cerca de 20 (vinte) vezes menor do que o volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue, e equivale a duas colheres de sopa. Este sangue será usado para todos os estudos laboratoriais mencionados acima. Serão feitas entrevistas de até duas horas de duração abordando assuntos relativos ao seu humor, vida sexual, episódios estressantes de seu passado, histórico familiar, entre outros assuntos pertinentes ao projeto. Se você for paciente, dados do seu prontuário do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto serão obtidos citando, por exemplo, nível de glicose sanguínea, medicamentos em uso, ou outras informações clínicas relevantes. Caso você tenha recebido indicação médica para uso de Sildenafil ou outros, repetiremos as entrevistas e coletas de sangue no momento de seu retorno após o tratamento com esse fármaco.

3) Seu material genético (DNA) será coletado, depositado, armazenado em um biorrepositório por até dez anos sob responsabilidade do coordenador do projeto. Após este período seu material genético poderá ser destruído. A qualquer momento você pode solicitar que suas amostras biológicas sejam devolvidas ou destruídas. O uso deste material será com fins unicamente de pesquisa relacionada à análise das informações genéticas contidas na amostra. Estudos futuros serão realizados mediante sua aprovação e análise do novo projeto pelo CEP. Em caso de não conseguirmos entrar em contato o CEP poderá decidir pelo uso das suas amostras em estudos futuros.

4) Você tem garantido o conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando aplicável, a qualquer tempo.

5) Você tem direito à indenização caso ocorra dano decorrente de sua participação na pesquisa por parte do pesquisador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa. Além disso, você terá direito a ressarcimento financeiro caso ocorram gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa, tendo como exemplo o transporte e alimentação, estendendo-se ao paciente e acompanhante, conforme as leis vigentes no país.

Folha 2/2

6) Os riscos físicos decorrentes da pesquisa são apenas os causados pela coleta de sangue por punção intravenosa. Pode ocorrer dor e formação de hematoma no local da punção. Se isto ocorrer, a equipe está orientada a aguardar sua absorção espontânea e utilizar compressas frias para amenizar a dor local. Além disto, há o risco de gerar tristeza e/ou ansiedade devido a perguntas de caráter pessoal contidas nos instrumentos de avaliações usados. Neste caso será oferecido apoio pela equipe envolvida na coleta, e se isto não for suficiente, entraremos em contato com a equipe médica. O paciente ou voluntário que venha participar dessa pesquisa, caso tenha algum dano decorrente da pesquisa, não abre mão dos seus direitos de indenização de acordo com as leis vigentes no país.

7) NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTE ESTUDO.

8) Indiretamente, acreditamos que este estudo trará como benefício um entendimento dos aspectos hereditários da disfunção erétil e seu tratamento.

9) Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos voluntários nela envolvidos.

10) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

11) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o procedimento a que será submetido. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Prof. Dr. Riccardo Lacchini (EERP) e ao Prof. Dr. Silvio Tucci Júnior (FMRP). O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da EERP é 16-3315-3386 (horário de funcionamento de segunda à sexta, das 8h às 17h) e o endereço é: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Campus Universitário - Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP – Brasil, CEP: 14040-902.

Eu, _____, abaixo assinado, declaro que em ____/____/____ fui informado em detalhes pelo pesquisador responsável sobre os objetivos da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à indenização quanto por danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas e acima relacionadas. Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Assinatura do voluntário Assinatura do investigador/testemunha

Responsáveis: Prof. Dr. Riccardo Lacchini (FMRP-USP) (0xx16 3315 3447) e Prof. Dr. Silvio Tucci Júnior (FMRP-USP) (0xx16)

Anexo 2: Índice Internacional de Função Erétil (IIEF)

Número_____

Projeto "**Bases Genéticas da disfunção erétil: Da resposta ao Stress à Produção de Óxido 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 freqüência 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 freqüência 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 freqüência 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 freqüência 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 freqüência 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 freqüência 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 freqüência 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 freqüência você tem sentido desejo sexual?	( ) Quase sempre ou sempre ( ) Freqüentemente (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: Guilhermo e Ana Maria

Anexo 3 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

USP - ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO DA USP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores e polimorfismos genéticos da AGXT2 e a relação com a Disfunção Erétil

Pesquisador: Anderson Heiji Lima Miyazaki

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

Versão: 2

CAAE: 89770618.2.0000.5393

Instituição Proponente: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.975.554

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto intitulado "Biomarcadores e polimorfismos genéticos da AGXT2 e a relação com a Disfunção Erétil", que já foi avaliado por este CEP. O parecer anterior já havia avaliado todas as questoes relativas aos aspectos éticos, restando pendente a questao da DISPENSA do tcle.

Foram pedidos novos esclarecimentos, no Projeto, para que se avaliasse a possibilidade da dispensa. Segundo este CEP, embora estivesse claro que este Projeto derivava de outro projeto maior, já aprovado, nao era possível compreender se haveria coleta de novas amostras, autônomas, para esta pesquisa proposta.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral da pesquisa coincide com o título do projeto, ou seja, analisar biomarcadores de polimorfismos genéticos e sua relação com a disfunção erétil. Os objetivos específicos são dois, conforme pág. 07 do Projeto: Verificar a relação entre o NO (óxido nítrico), níveis plasmáticos de SDMA (uma enzima, como explica o projeto)e o risco de desenvolvimento da Disfunção Erétil. O segundo objetivo específico é verificar se polimorfismos genéticos do AGXT2 (outra enzima) relacionam-se com a Disfunção Erétil e resposta ao tratamento farmacológico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A dúvida que havia quanto aos riscos foram sanadas nesta nova apresentacao do Projeto, como se

Endereço: BANDEIRANTES 3900
Bairro: VILA MONTE ALEGRE **CEP:** 14.040-902
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-9197 **E-mail:** cep@eerp.usp.br

comentará no item adiante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O novo projeto, apresentado para esta avaliaçao, esclarece bem a dúvida que este CEP havia levantado. Está formado um BIORREPOSITÓRIO pelo projeto anterior, que será apenas acessado pelo presente projeto, menor. Assim, à fl. 07 do Projeto, nesta nova submissao, esclarece: "O projeto maior envolve a assinatura de um TCLE e coleta de amostras clínicas e dados dos pacientes que ficam armazenados em um biorrepositório. O presente projeto apenas acessa amostras e dados clínicos previamente obtidos e não fará, hem hipótese alguma qualquer nova coleta ou qualquer novo contato com os pacientes". Diante disso, a dúvida do parecer deste CEP está sanada. Como mera derivacao do anterior, e sem nenhum risco SUPLEMENTAR ao projeto maior, o TCLE pode ser dispensado.

3.2 Seleção

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Esclarecida a dúvida quanto à inexistência de coleta de mais material, havendo apenas consulta a biorrepositório de projeto maior, a dispensa de novo TCLE é razoável. Os demais termos já foram avaliados em projeto anterior.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado, sem pendencias.

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer aprovado ad referendum

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1004153.pdf	18/09/2018 11:46:11		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projAndersonressub1709v31revricc.pdf	18/09/2018 11:44:24	Anderson Heiji Lima Miyazaki	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAV1708.pdf	17/08/2018 11:47:49	Anderson Heiji Lima Miyazaki	Aceito

USP - ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO DA USP

Continuação do Parecer: 2.975.554

Outros	encaminhamentocep.pdf	16/05/2018 09:45:34	Riccardo Lacchini	Aceito
Orçamento	ORcAMENTO.pdf	14/05/2018 15:18:42	Riccardo Lacchini	Aceito
Folha de Rosto	scanner_3503_0001.pdf	09/03/2018 11:48:14	Anderson Heiji Lima Miyazaki	Aceito
Outros	autorizacaoacessobiorrepositorio.pdf	16/02/2018 10:27:32	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	parecercepprojetogrande.pdf	16/02/2018 10:26:40	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	TCLEprojetogrande.pdf	16/02/2018 10:26:14	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	Projetogrande.pdf	16/02/2018 10:25:52	Riccardo Lacchini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	justificativa.pdf	10/10/2017 11:15:57	Anderson Heiji Lima Miyazaki	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 22 de Outubro de 2018

Assinado por:
Angelita Maria Stabile
(Coordenador(a))

Endereço: BANDEIRANTES 3900
Bairro: VILA MONTE ALEGRE **CEP:** 14.040-902
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-9197 **E-mail:** cep@eerp.usp.br

Anexo 4 – Estudo aceito para publicação.

DDAH1 and *DDAH2* polymorphisms associate with asymmetrical dimethylarginine plasma levels in erectile dysfunction patients but not in healthy controls

Guilhermo Brites-Anselmi[a], Ana Maria Milanez Azevedo[b]; Anderson Heiji Lima Miyazaki[a], Lucas Cezar Pinheiro[a], Fernanda Borchers Coeli-Lacchini[c]; Murilo Ferreira de Andrade[d], Carlos Augusto Fernandes Molina[d]; Silvio Tucci Jr[d]; Emilio Hirsch[e] Jose Eduardo Tanus-Santos[b], Riccardo Lacchini[a]*

[a] Department of Psychiatric Nursing and Human Sciences – Ribeirao Preto College of Nursing – University of Sao Paulo, Brazil

[b] Department of Pharmacology – Ribeirao Preto Medical School – University of Sao Paulo, Brazil

[c] Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Sciences - School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Brazil

[d] Department of Surgery and Anatomy - Ribeirao Preto Medical School – University of Sao Paulo, Brazil

[e] Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences - University of Torino, Italy

* Corresponding Author: Riccardo Lacchini

Ribeirao Preto College of Nursing, University of Sao Paulo

Av. Bandeirantes 3900, Ribeirao Preto, SP, Brazil

CEP 14040-902

Telephone number: +55 16 3315 3447

Fax number: +55 16 3315 0518

E-mail: rlacchini@eerp.usp.br; rlacchini@hotmail.com

Word count: 2088 words

Abstract

Erectile Dysfunction (ED) is one of the main complaints of aging male. A reduced production of Nitric Oxide (NO) may be involved in ED pathogenesis. NO is synthesized from L-Arginine, and asymmetrical dimethylarginine inhibits all NO synthases. *DDAH1* and *DDAH2* are genes that encode enzymes responsible for metabolizing ADMA. We aimed to assess whether: 1) ADMA and nitrite levels associated with ED risk and with symptoms intensity; and whether 2) DDAH1 and DDAH2 gene polymorphisms associate with changes in biochemical data, and with ED risk and symptoms intensity. In this study were included 98 healthy controls and 130 ED patients. ADMA levels were measured by ELISA and nitrite levels by Chemiluminescence. *DDAH1* and *DDAH2* polymorphisms were assessed by Taqman assays. We found that ED had increased nitrite levels and lower ADMA levels than Control group ($P<0.05$). We found a significant correlation of ADMA with Nitrite levels only in ED ($B=-0.57$, $P<0.001$). Genotypes and haplotypes of *DDAH1* were associated with ADMA levels in ED ($P<0.05$), while haplotypes of *DDAH2* were associated with levels of nitrite in ED ($P<0.05$). Erectile dysfunction patients show an association between *DDAH1* and *DDAH2* polymorphisms with ADMA levels, which in turn are negatively correlated with nitrite levels. This is not evident on healthy controls.

Keywords – Asymmetrical dimethylarginine; Nitric Oxide; Erectile Dysfunction; *DDAH1*; *DDAH2*; genetic polymorphisms

Introduction

Erectile dysfunction (ED) is a condition characterized by an erection that is insufficient for a successful sexual intercourse [1; 2; 3]. This is one of the main urologic complaints of aging male [2; 3], and it is considered a marker for other cardiovascular-related complications [4; 5]. The physiological mechanism of erection involves the production of Nitric Oxide (NO) [2; 6; 7]. NO will signal for smooth muscle to relax, allowing vasorelaxation and expansion of corpora cavernosa, which in turn will press venules against tunica albuginea, trapping blood within penis, allowing for full erection [6; 7]. Disease state may lead to a reduction of NO production by endothelial dysfunction and may lead to NO scavenging and transformation into peroxynitrite, which is a toxic compound [8]. The progression of disease may result in permanent changes by tissue remodeling, making cavernosal tissue unresponsive to NO [9]. It is imperative to perform an early screening and treatment with both drugs that allow for a regular sexual life, and non-pharmacological approaches that may help to halt disease progression, reducing morbidity [10]. Among several factors that affect sexual life, nitric oxide bioavailability is one of the most important.

Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) is a natural compound produced by our body after proteolysis of methylated proteins. This compound is very similar to L-Arginine that is used for NO synthesis and is able to attach to the substrate pocket of NO synthases. Therefore when ADMA interacts with this site, L-Arginine cannot bind to the enzyme, leading to reduced NO production [11; 12]. High ADMA levels are associated with cardiovascular disease and with ED, as previously described [13; 14]. Usually, ADMA levels do not accumulate, as there are enzymes called dimethylarginine dimethylaminohydrolase type 1 and 2 (DDAH1 and 2, respectively) that metabolize ADMA [12; 15; 16]. These enzymes are encoded by *DDAH1* and *DDAH2* genes, respectively, which have in their sequence important genetic polymorphisms that may alter the protein activity and expression[17; 18; 19; 20]. Recently, we have shown that these polymorphisms have an impact on Sildenafil responsiveness in vascular ED [21], which leads us to believe these could also increase risk for developing ED.

Here we aim to assess whether: 1) ADMA levels reflects a NO marker (nitrite) on ED patients and healthy controls; 2) ADMA are associated with risk for ED and the magnitude of erectile function (assessed by the international index for erectile function);

3) genetic polymorphisms of *DDAH1* and *DDAH2* are associated with changes in ADMA levels, nitrite levels and ED risk and erectile function.

Materials and Methods

Subjects

This study was approved by our institutional Human Ethics Committee under the number CAAE: 51399015.3.0000.5393 and complied to the declaration of Helsinki. ED group was composed by 130 subjects followed at the Urology Outpatient Clinic at the University Hospital of Ribeirão Preto Medical School. Healthy controls (n=98) were recruited from the Campus of the University of São Paulo at Ribeirão Preto, among faculty staff, passer-by subjects, or students. All subjects provided their written informed consent. Inclusion criteria for both groups was age between 40 and 80 years, while ED group had additionally medical diagnosis of ED and complaints about sexual activity. Exclusion criteria for both groups were anatomical abnormalities (i.e. Peyronie's disease), penile implants, neurogenic bladder dysfunction, hormonal diseases (hypogonadism, hypothyroidism), cardiovascular events (cardiac infarction, cerebrovascular accidents), central nervous system trauma psychiatric disorders, and diagnosis of prostate hyperplasia or cancer. Additionally, we also excluded subjects from Control group when International Index of Erectile Function (IIEF) score was below 26.

After informed consent was signed, subjects underwent physical and medical examination. Afterwards, blood pressure was measured after a 5-minutes resting time, followed by application of the IIEF questionnaire [22], and blood collection by antecubital venipuncture. Blood was immediately centrifuged at 1000g for 5 minutes to obtain plasma samples, which were stored at -80°C. Whole blood samples were used for DNA extraction, which was stored at -20°C.

Laboratory Analysis

Lipid profile, glucose, testosterone, urea and creatinine were measured by commercially available kits and following manufacturer's instructions. Low-density lipoprotein was calculated using Friedewald's formula.

Asymmetrical Dimethylarginine and Nitrite Quantification

ADMA levels were measured by Competitive Enzyme Linked Immunoassay (ELISA) using a commercially available kit (Elabscience, cat# E-EL-0042, Wuhan, China). Absorbance at 450nm was measured using the µQuant microplate spectrophotometer (BioTek, Winooski, USA), and 4-parameter fitting was performed using a freely available online tool (www.elisaanalysis.com). Nitrite quantification was performed as previously described [23] using an ozone-based chemiluminescent method. This method uses an acid triiodide solution purged with nitrogen gas. When samples are added to the solution, nitrite is reduced to NO and the nitrogen stream takes it into the equipment reaction chamber (Nitric Oxide analyzer - Sievers 280, Boulder, CO, USA). There, NO reacts with ozone producing light, that is measured by the equipment.

DDAH1 and DDAH2 genetic analysis

We genotyped two single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *DDAH1*, rs1554597 and rs18582, and two of *DDAH2*, rs805304 and rs805305, following procedures previously described [21]. Haplotype estimation was performed using PHASE v2.1 software (http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html). The possible haplotypes were TG, TA, CG, CA (rs1554597 T>C and rs18582 G>A) and CC, CG, AC, AG (rs805304 C>A and rs805305 C>G). Linkage analysis was performed using Haploview[24] version 4.2 (available at www.broadinstitute.org/haploview/haploview)

Statistical analysis

Here we performed unadjusted tests, comprising chi-squared tests (categorical variables), Student's T test or ANOVA followed by Tukey's post hoc test (parametric data), or Mann-Whitney and Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc test (non-parametric data). Besides this, we also constructed logistic and linear multivariate models accounting for confounding factors. Independent variables were age, smoking status, diabetes and genetic data, while dependent variables were group (multivariate logistic regression), or ADMA or Nitrite levels (multivariate linear regression).

Results

Clinical data of subjects included in Control and ED groups are presented in Table 1. There were some differences between groups, such as age, smoking status, systolic blood

pressure, lipidogram, creatinine, hypertension, diabetes and IIEF score. All these parameters have been considered when building multivariate linear and logistic models. Besides that, we found that ED patients had increased levels of Nitrite and reduced levels of ADMA when compared to Control group (Table 1). Besides that, while in patients there was a negative correlation between nitrite and ADMA levels, in Control group there was no correlation (Figure 1). These results were confirmed by multivariate analysis.

It was also found a negative correlation between nitrite levels and erectile function assessed by IIEF (Figure 2) on ED group, which was absent in Control group. This, however, did not resist after multivariate analysis. ADMA levels did not correlate with IIEF score.

Going further, we analyzed whether genotypes for *DDAH1* and *DDAH2* genes would be associated with disease risk, with erectile function and with changes in biochemical data. All genotypes distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown) and rs805304 and rs805305 were in high linkage disequilibrium (Supplementary Figure 1). We found that both *DDAH1* polymorphisms were associated with ADMA levels only in ED group (multivariate analysis, additive models; Table 2). Besides, we found both in unadjusted and adjusted analysis that *DDAH1* TG and CA haplotypes were associated with increases and decreases of ADMA levels, respectively. On the other hand, *DDAH2* CC and AG haplotypes associate with reduced and increased Nitrite levels, respectively only on multivariate models (Tables 4 and 5 for adjusted analysis; Figure 3 and Supplementary Figure 2 for unadjusted analysis). Although genotypes were associated with changes in biochemical data, there was no association between genotypes and disease risk (Supplementary Table 1), nor with changes in IIEF score (Supplementary Figure 3).

Discussion

Our novel findings reported here: 1) ADMA, nitrite and genetic markers seem to be significantly associated, especially when disease is present; 2) ADMA plasma levels are not associated with IIEF score; 3) Nitrite and EF correlate negatively in ED. In addition, previously published associations were reproduced here: 1) ADMA and Nitrite correlate negatively in ED; 2) DDAH1 polymorphisms were associated with changes in ADMA levels in ED; 3) DDAH2 polymorphisms were related to changes in nitrite levels in ED.

NO is the main vasorelaxation agent and has pivotal importance in erectile function[1]. Its main metabolites are nitrite and nitrate, however, nitrite serves as a marker for recent NOS activity, since its plasma half-life is very short (around 5 minutes)[8]. Therefore, nitrite levels could help to predict the health of endothelial cells[8]. Here we found a result that may seem paradoxical at a first glance: increased levels of nitrite in ED patients. However, our control group has levels of nitrite that are within average levels of the literature [8]. We believe that this increase in nitrite levels may involve an activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) due to inflammatory processes, that actually have been shown in the literature[8]. This is consistent with previous results showing that Sildenafil responsiveness was better in patients with reduced nitrite levels[21; 25; 26].

ADMA is an endogenous inhibitor of all NO synthases [11; 12; 16] and has been suggested to directly disturb endothelial function [14]. ADMA could inhibit NO synthases when present on cytoplasm[16], and could also reduce L-Arginine inflow to endothelial cells by interacting with specific amino acid transporters, leading to a compartmental substrate exhaustion[15], and reduced NO due to low L-Arginine inside endothelial cell. All these processes are difficult to assess clinically, since we only have easy access to plasma. Here we found reduced levels of ADMA on disease. This is paradoxical, since high ADMA levels have been implicated in different cardiovascular diseases [13]. Furthermore, increased inflammation is known to reduce *DDAH1* expression [27] and higher ADMA levels were observed in ED [14]. On the other hand, reduced ADMA in ED will implicate in increased NO production, for instance by iNOS enzyme and thus more tissue damage elicited by peroxynitrite under oxidative stress conditions. Interestingly, this is consistent with reports showing that metabolic syndrome and diabetes patients have higher plasma levels of nitrite or nitrite + nitrate (NOx) [28; 29; 30]. Future studies comparing levels of nitrite, methylated forms of Arginine and inflammatory markers in ED with and without concurrent diabetes and metabolic syndrome are warranted to clarify this.

Although associated with ED group, both nitrite and ADMA levels did not correlate with the intensity of ED symptoms given by IIEF Score (Figure 2). This is interesting and may explain the lack of association of the genetic markers with ED risk (Supplementary Table 1).

The main enzyme involved in ADMA clearance from plasma is *DDAH1*[31; 32]. We clearly found that genotypes and haplotypes in this gene are associated with changes in ADMA plasma levels (Table 2 and 4, Figure 3). The association we found of rs18582 with plasma levels is consistent with previous results, where GG carriers had higher while A allele carriers had lower ADMA levels [21]. This is also consistent with a GWAS data with a very robust sample size [18]. The association of *DDAH1* haplotypes with ADMA levels (Figure 3) was not found previously [21]. Possibly, a higher number of participants here allowed us to observe this association. Although associated with biochemical variability, these genetic markers did not increased risk to develop ED (Supplementary Table 1), nor associated with symptoms intensity (Supplementary Figure 3).

*DDAH2, o*n the other hand, is mainly expressed in other tissues, including endothelial cells [31; 32]. We found here only in controls an association of *DDAH2* genotypes of rs18582 with nitrite levels (Table 3), while in patients we found that *DDAH2* haplotypes associated with nitrite levels (Table 5). Interestingly, the CC haplotype associated with lower nitrite combines alleles of two polymorphisms that were previously associated with increased ADMA [19; 20]. These subtle effects of genetic markers are not always observed, as *DDAH1* haplotypes associated with changes in ADMA on plasma did not reflect on changes of nitrite in plasma in our work. It is possible that ADMA within endothelial cells compartment may be more important in determining NO production than circulating ADMA. More studies are needed to address this.

This study has some strengths, such as the well characterized phenotype of patients. Here we excluded any psychological, endocrine, neurological and anatomical causes for ED. Thus we enriched our Patients sample with vasculogenic ED. We cannot affirm this is complete, since we did not exclude diabetic patients. These have both vasculogenic and neurogenic alterations that occur concurrently. Besides, different articles associated diabetes and metabolic syndrome with higher levels of nitrite or NOx [28; 29; 30]. This may be a limitation of our study, as the increased levels of nitrite we show in ED patients may have been driven by a higher proportion of diabetes patients in that group than in Control group. Besides that, we analyzed a small (although not underpowered) sample size, and therefore we may have missed very subtle associations or risk increases.

We conclude here that *DDAH1* and *DDAH2* genotypes are associated with changes in ADMA or Nitrite, and that changes in these markers appear only in the pathological condition of erectile dysfunction.

Acknowledgements: This work was supported by the FAPESP (Grant # 2016/04449-0), CNPq (Grant # 302241/2017-5); CAPES (student's scholarships)

Declaration of interest: The authors report no conflict of interest

References

[1] R. Lacchini, J.E. Tanus-Santos, Pharmacogenetics of erectile dysfunction: navigating into uncharted waters, Pharmacogenomics 15 (2014) 1519-38.
[2] R. Shamloul, H. Ghanem, Erectile dysfunction, Lancet 381 (2013) 153-65.
[3] L. Chen, G.R. Shi, D.D. Huang, Y. Li, C.C. Ma, M. Shi, B.X. Su, G.J. Shi, Male sexual dysfunction: A review of literature on its pathological mechanisms, potential risk factors, and herbal drug intervention, Biomed Pharmacother 112 (2019) 108585.
[4] N.P. Shah, M. Cainzos-Achirica, D.I. Feldman, R.S. Blumenthal, K. Nasir, M.M. Miner, K.L. Billups, M.J. Blaha, Cardiovascular Disease Prevention in Men with Vascular Erectile Dysfunction: The View of the Preventive Cardiologist, Am J Med 129 (2016) 251-9.
[5] B.A. Inman, J.L. Sauver, D.J. Jacobson, M.E. McGree, A. Nehra, M.M. Lieber, V.L. Roger, S.J. Jacobsen, A population-based, longitudinal study of erectile dysfunction and future coronary artery disease, Mayo Clin Proc 84 (2009) 108-13.
[6] K.J. Hurt, B. Musicki, M.A. Palese, J.K. Crone, R.E. Becker, J.L. Moriarity, S.H. Snyder, A.L. Burnett, Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection, Proc Natl Acad Sci U S A 99 (2002) 4061-6.
[7] K.J. Hurt, S.F. Sezen, G.F. Lagoda, B. Musicki, G.A. Rameau, S.H. Snyder, A.L. Burnett, Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection, Proc Natl Acad Sci U S A 109 (2012) 16624-9.
[8] G.H. Oliveira-Paula, R. Lacchini, J.E. Tanus-Santos, Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms, Gene 575 (2016) 584-99.
[9] R.C. Tostes, F.S. Carneiro, A.J. Lee, F.R. Giachini, R. Leite, Y. Osawa, R.C. Webb, Cigarette smoking and erectile dysfunction: focus on NO bioavailability and ROS generation, J Sex Med 5 (2008) 1284-95.
[10] J.P. Mulhall, A. Giraldi, G. Hackett, W.J.G. Hellstrom, E.A. Jannini, E. Rubio-Aurioles, L. Trost, T.A. Hassan, The 2018 Revision to the Process of Care Model for Management of Erectile Dysfunction, J Sex Med (2018).
[11] G. Bouras, S. Deftereos, D. Tousoulis, G. Giannopoulos, G. Chatzis, D. Tsounis, M.W. Cleman, C. Stefanadis, Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease?, Curr Top Med Chem 13 (2013) 180-200.
[12] Y.L. Tain, C.N. Hsu, Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA), Toxins (Basel) 9 (2017).
[13] R.H. Boger, H.G. Endres, E. Schwedhelm, H. Darius, D. Atzler, N. Luneburg, B. von Stritzky, R. Maas, U. Thiem, R.A. Benndorf, C. Diehm, Asymmetric dimethylarginine

as an independent risk marker for mortality in ambulatory patients with peripheral arterial disease, J Intern Med 269 (2011) 349-61.
[14] R. Paroni, A. Barassi, F. Ciociola, E. Dozio, E. Finati, I. Fermo, F. Ghilardi, G.M. Colpi, M.M. Corsi, G.V. Melzi d'Eril, Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and L-arginine in patients with arteriogenic and non-arteriogenic erectile dysfunction, Int J Androl 35 (2012) 660-7.
[15] H. Masuda, 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 15 (2008) 128-34.
[16] A.J. Pope, K. Karuppiah, A.J. Cardounel, Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production, Pharmacol Res 60 (2009) 461-5.
[17] M. Anderssohn, S. McLachlan, N. Luneburg, C. Robertson, E. Schwedhelm, R.M. Williamson, M.W. Strachan, R. Ajjan, P.J. Grant, R.H. Boger, J.F. Price, Genetic and environmental determinants of dimethylarginines and association with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes, Diabetes Care 37 (2014) 846-54.
[18] N. Luneburg, W. Lieb, T. Zeller, M.H. Chen, R. Maas, A.M. Carter, V. Xanthakis, N.L. Glazer, E. Schwedhelm, S. Seshadri, M.A. Ikram, W.T. Longstreth, Jr., M. Fornage, I.R. Konig, C. Loley, F.M. Ojeda, A. Schillert, T.J. Wang, H. Sticht, A. Kittel, J. Konig, E.J. Benjamin, L.M. Sullivan, I. Bernges, M. Anderssohn, A. Ziegler, C. Gieger, T. Illig, C. Meisinger, H.E. Wichmann, P.S. Wild, H. Schunkert, B.M. Psaty, K.L. Wiggins, S.R. Heckbert, N. Smith, K. Lackner, K.L. Lunetta, S. Blankenberg, J. Erdmann, T. Munzel, P.J. Grant, R.S. Vasan, R.H. Boger, Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine, Circ Cardiovasc Genet 7 (2014) 864-72.
[19] M. Marra, F. Marchegiani, A. Ceriello, C. Sirolla, M. Boemi, C. Franceschi, L. Spazzafumo, I. Testa, A.R. Bonfigli, M. Cucchi, R. Testa, Chronic renal impairment and DDAH2-1151 A/C polymorphism determine ADMA levels in type 2 diabetic subjects, Nephrol Dial Transplant 28 (2013) 964-71.
[20] M.J. O'Dwyer, F. Dempsey, V. Crowley, D.P. Kelleher, R. McManus, T. Ryan, 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 10 (2006) R139.
[21] A.M.M. Azevedo, G. Brites-Anselmi, L.C. Pinheiro, V. de Almeida Belo, F.B. Coeli-Lacchini, C.A.F. Molina, M.F. de Andrade, S. Tucci, Jr., E. Hirsch, J.E. Tanus-Santos, R. Lacchini, Relationship between asymmetric dimethylarginine, nitrite and genetic polymorphisms: Impact on erectile dysfunction therapy, Nitric Oxide 71 (2017) 44-51.
[22] R.C. Rosen, A. Riley, G. Wagner, I.H. Osterloh, J. Kirkpatrick, A. Mishra, The international index of erectile function (IIEF): a multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction, Urology 49 (1997) 822-30.
[23] L.C. Pinheiro, J.H. Amaral, G.C. Ferreira, R.L. Portella, C.S. Ceron, M.F. Montenegro, J.C. Toledo, J.E. Tanus-Santos, Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension, Free Radical Biology and Medicine 87 (2015) 252-262.
[24] J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller, M.J. Daly, Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, Bioinformatics 21 (2005) 263-5.
[25] J.J. Muniz, R. Lacchini, J.T. Sertorio, A.A. Jordao, Jr., Y.T. Nobre, S. Tucci, Jr., A.C. Martins, J.E. Tanus-Santos, Low nitric oxide bioavailability is associated with better responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 386 (2013) 805-11.
[26] R. Lacchini, J.J. Muniz, Y.T. Nobre, A.J. Cologna, A.C. Martins, J.E. Tanus-Santos, nNOS polymorphisms are associated with responsiveness to sildenafil in clinical and postoperative erectile dysfunction, Pharmacogenomics 15 (2014) 775-84.
[27] V. Balasubramanian, G. Mehta, H. Jones, V. Sharma, N.A. Davies, R. Jalan, R.P. Mookerjee, Post-Transcriptional Regulation of Hepatic DDAH1 with TNF Blockade

Leads to Improved eNOS Function and Reduced Portal Pressure In Cirrhotic Rats, Sci Rep 7 (2017) 17900.
[28] F. Akram, D. Fuchs, M. Daue, G. Nijjar, A. Ryan, M.E. Benros, O. Okusaga, E. Baca-Garcia, L.A. Brenner, C.A. Lowry, K.A. Ryan, M. Pavlovich, B.D. Mitchell, S. Snitker, T.T. Postolache, Association of plasma nitrite levels with obesity and metabolic syndrome in the Old Order Amish, Obes Sci Pract 4 (2018) 468-476.
[29] J. Ueyama, T. Kondo, R. Imai, A. Kimata, K. Yamamoto, K. Suzuki, T. Inoue, Y. Ito, K. Miyamoto, T. Hasegawa, N. Hamajima, Association of serum NO(x) level with clustering of metabolic syndrome components in middle-aged and elderly general populations in Japan, Environ Health Prev Med 13 (2008) 36-42.
[30] T.S. Assmann, L.A. Brondani, A.P. Boucas, J. Rheinheimer, B.M. de Souza, L.H. Canani, A.C. Bauer, D. Crispim, Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis, Nitric Oxide 61 (2016) 1-9.
[31] N. Luneburg, L. Harbaum, J.K. Hennigs, The endothelial ADMA/NO pathway in hypoxia-related chronic respiratory diseases, Biomed Res Int 2014 (2014) 501612.
[32] D. Wang, P.S. Gill, T. Chabrashvili, M.L. Onozato, J. Raggio, M. Mendonca, K. Dennehy, M. Li, P. Modlinger, J. Leiper, P. Vallance, O. Adler, A. Leone, A. Tojo, W.J. Welch, C.S. Wilcox, Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO, Circ Res 101 (2007) 627-35.

Tables with captions

Table 1 – Clinical features of studied subjects

Clinical features	Control (n = 98)	ED (n = 130)
Age (years)	47 ± 9	55 ± 11*
Ethnicity (whites / non-whites)	52/46	68/62
BMI (Kg/m^2)	27.7 ± 4.3	28.1 ± 4.8
Physical Exercise Practitioners (n)	59	72
Smoking status (n)		
Smokers	15	19
Ex-smokers	23	62*
Non-smokers	60	49
Ethanol Consumption (%)	11	10
SBP (mmHg)	130 ± 19	138 ± 19*
DBP (mmHg)	88 ± 13	89 ± 13
Total Cholesterol (mg/dL)	201 ± 42	181 ± 38*
HDL Cholesterol(mg/dL)	36 ± 11	41 ± 9*
LDL Cholesterol (mg/dL)	127 ± 38	112 ± 35*
Triglycerides (mg/dL)	175 ± 106	161 ± 111
Glucose (mg/dL)	100 ± 41	128 ± 55*
Urea (mg/dL)	35 ± 9	33 ± 12
Creatinine (mg/dL)	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3*
Hypertensive (n)	0	62*
Diabetic (n)	5	52*
EF Score	29 ± 1	10 ± 7*
ADMA (μM)	0.90 ± 0.33 (n = 87)	0.81 ± 0.32 (n = 84)*
Nitrite (μM)	134 ± 73 (n = 92)	192 ± 172 (n = 112)*

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; EF Score, score obtained at the erectile function domain from the International Index of Erectile Function.
[a] Ethanol consumption was defined as taking a dose of ethanol higher than 30g per day.
Data expressed as means ± standard deviation, absolute numbers (n) or relative frequencies (%). * P <0.05 *versus* Control.

Table 2 – Multivariate linear regression analysis showing the association of studied polymorphisms with changes in ADMA levels on Patients and Controls in additive, dominant and recessive models.

		Control (n = 87)						ED (n = 84)					
Model		Additive		Dominant		Recessive		Additive		Dominant		Recessive	
		R^2 = 0.12 RMSE = 0.16		R^2 = 0.10 RMSE = 0.16		R^2 = 0.11 RMSE = 0.16		R^2 = 0.21 RMSE = 0.16		R^2 = 0.04 RMSE = 0.17		R^2 = 0.09 RMSE = 0.16	
		β	P	β	P	β	P	β	P	β	P	β	P
Age (years)		-0.01	0.080	-0.01	0.119	-0.01	0.081	-0.01	0.538	-0.01	0.754	-0.01	0.518
Smoking Status													
Smokers		-0.07	0.032	-0.07	0.030*	-0.07	0.034*	-0.03	0.401	-0.02	0.568	-0.03	0.338
Ex-smokers		+0.06	0.072	+0.05	0.086	+0.05	0.081	-0.01	0.657	-0.01	0.608	-0.01	0.969
Non-smokers		+0.02	0.378	+0.02	0.326	+0.02	0.386	+0.04	0.153	+0.03	0.243	+0.03	0.237
Diabetes (yes)		+0.03	0.404	+0.03	0.371	+0.03	0.410	+0.01	0.475	+0.01	0.752	+0.01	0.527
DDAH1													
rs1554597	TT	-0.01	0.750	+0.01	0.613	+0.01	0.583	**+0.13**	**0.008***	-0.01	0.664	+0.05	0.082
	TC	+0.02	0.613	-0.01	0.613	-0.01	0.583	**+0.09**	**0.016***	+0.01	0.664	-0.05	0.082
	CC	-0.01	0.943					**-0.22**	**< 0.001***				
		Global P = 0.850						**Global P = 0.002***					
rs18582	GG	-0.04	0.438	-0.02	0.401	-0.02	0.218	**+0.22**	**< 0.001***	+0.03	0.326	**+0.04**	**0.032***
	GA	-0.01	0.690	+0.02	0.401	+0.02	0.218	**-0.06**	**0.097**	-0.03	0.326	**-0.04**	**0.032***
	AA	+0.05	0.214					**-0.16**	**0.001***				
		Global P = 0.446						**Global P = 0.002***					
DDAH2													
rs805304	CC	-0.01	0.670	-0.01	0.817	-0.01	0.693	-0.01	0.958	+0.01	0.897	+0.01	0.709
	CA	-0.01	0.948	+0.01	0.817	+0.01	0.693	+0.01	0.804	-0.01	0.897	-0.01	0.709
	AA	+0.01	0.650					-0.01	0.882				
		Global P = 0.891						Global P = 0.968					
rs805305		-		-		-	-	-		-	-	-	-

R^2, proportion of the variability explained by our model; RMSE, root mean square error. ADMA levels were log-transformed for this statistical analysis. Since in our sample rs805304 and rs805305 were in strong linkage disequilibrium (see Supplementary Figure 3 in Supplementary Materials file), we could not consider both as independent variables. Therefore we inserted in our model only rs805304, and we considered these genotypes marking for the presence of rs805305 genotypes: CC/CC, CA/CG and AA/GG. * P <0.05 statistically significant.

Table 3 – Multivariate linear regression analysis showing the association of studied polymorphisms with changes in Nitrite levels on Patients and Controls in additive, dominant and recessive models.

		Control (n = 92)						ED (n = 112)					
Model		Additive		Dominant		Recessive		Additive		Dominant		Recessive	
		R^2 = 0.13 RMSE = 0.18		R^2 = 0.12 RMSE = 0.18		R^2 = 0.06 RMSE = 0.19		R^2 = 0.09 RMSE = 0.25		R^2 = 0.08 RMSE = 0.25		R^2 = 0.08 RMSE = 0.25	
		β	P	β	P	β	P	B	P	β	P	β	P
Age (years)		-0.00	0.426	-0.00	0.384	-0.00	0.566	+0.00	0.382	+0.00	0.298	+0.00	0.437
Smoking Status													
Smokers		-0.02	0.686	-0.02	0.530	-0.03	0.469	+0.04	0.410	+0.04	0.406	+0.03	0.516
Ex-smokers		-0.01	0.765	-0.01	0.886	-0.00	1.000	+0.04	0.326	+0.03	0.370	+0.04	0.270
Non-smokers		+0.03	0.355	+0.03	0.301	+0.03	0.321	-0.07	0.051	-0.07	0.061	-0.07	0.066
Diabetes (yes)		-0.05	0.285	-0.05	0.295	-0.05	0.301	+0.01	0.816	+0.01	0.800	+0.00	0.884
DDAH1													
rs1554597	TT	+0.04	0.390	+0.00	0.902	-0.03	0.410	-0.01	0.879	+0.02	0.415	-0.03	0.450
	TC	+0.02	0.532	-0.00	0.902			-0.05	0.338	-0.02	0.415		
	CC	-0.06	0.272			+0.03	0.410	+0.06	0.449			+0.03	0.450
		Global P = 0.544						Global P = 0.593					
rs18582	GG	**+0.15**	**0.009***	**+0.08**	**0.009***	+0.02	0.479	-0.04	0.561	+0.01	0.872	-0.03	0.297
	GA	-0.07	0.080	**-0.08**	**0.009***			+0.01	0.769	-0.01	0.872		
	AA	-0.09	0.061			-0.02	0.479	+0.03	0.651			+0.03	0.297
		Global P = 0.031*						Global P = 0.844					
DDAH2													
rs805304	CC	-0.00	0.933	+0.00	0.915	-0.01	0.546	-0.06	0.151	-0.04	0.169	-0.04	0.165
	CA	-0.01	0.750	-0.00	0.915			+0.00	0.905	+0.04	0.169		
	AA	+0.01	0.717			+0.01	0.546	+0.05	0.166			+0.04	0.165
		Global P = 0.920						Global P = 0.294					
rs805305		-		-		-		-		-		-	

R^2, proportion of the variability explained by our model; RMSE, root mean square error. Nitrite levels were log-transformed for this statistical analysis. Since in our sample rs805304 and rs805305 were in strong linkage disequilibrium (see Supplementary Figure 3 in Supplementary Materials file), we could not consider both as independent variables. Therefore we inserted in our model only rs805304, and we considered these genotypes marking for the presence of rs805305 genotypes: CC/CC, CA/CG and AA/GG. * P <0.05 statistically significant.

Table 4 – Multivariate linear regression analysis showing the association of *DDAH1* and *DDAH2* haplotypes with changes in ADMA levels on Patients and Controls

Model		Control (n = 174)		ED (n = 168)	
		R^2 = 0.11	RMSE = 0.15	R^2 = 0.09	RMSE = 0.16
		β	P	β	P
Age (years)		-0.01	0.012	-0.01	0.638
Smoking Status					
Smokers		-0.07	0.001	-0.02	0.236
Ex-smokers		+0.05	0.009	-0.01	0.575
Non-smokers		+0.02	0.017	+0.04	0.056
Diabetes (yes)		+0.04	0.158	+0.01	0.487
DDAH1					
	TG	-0.01	0.768	**+0.12**	**0.016***
	TA	+0.01	0.866	+0.01	0.594
	CG	-0.04	0.089	+0.05	0.082
	CA	+0.05	0.230	**-0.18**	**0.002***
		Global P = 0.240		**Global P = 0.008***	
DDAH2					
	CC	-0.01	0.442	+0.01	0.401
	CG	-	-	-	-
	AC	-	-	-	-
	AG	+0.01	0.442	-0.01	0.401

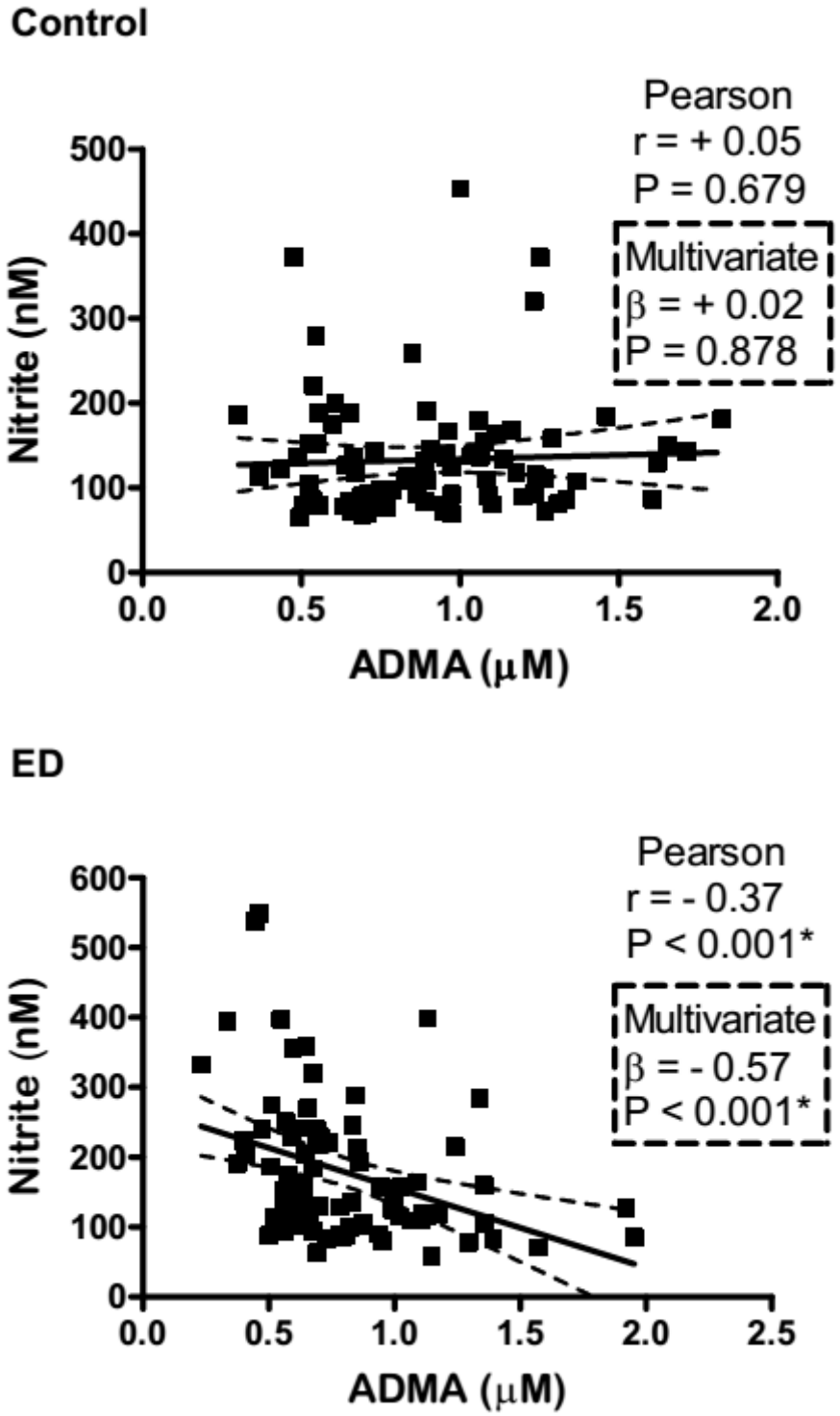
R^2, proportion of the variability explained by our model; RMSE, root mean square error.
ADMA levels were log-transformed for this statistical analysis. Haplotypes CG and AC of *DDAH2* gene were excluded from statistical analysis since its frequencies were below 2%
* P <0.05 statistically significant.

Table 5 – Multivariate linear regression analysis showing the association of *DDAH1* and *DDAH2* haplotypes with changes in nitrite levels on Patients and Controls

Model		Control (n = 182)		ED (n = 224)	
		R^2 = 0.06	RMSE = 0.18	R^2 = 0.08	RMSE = 0.25
		B	P	B	P
Age (years)		-0.00	0.515	+0.00	0.181
Smoking Status					
Smokers		-0.02	0.482	+0.03	0.385
Ex-smokers		-0.01	0.751	+0.04	0.116
Non-smokers		+0.03	0.171	-0.06	0.011*
Diabetes (yes)		-0.06	0.093	+0.01	0.745
DDAH1					
	TG	+0.06	0.272	-0.05	0.438
	TA	-0.01	0.833	+0.06	0.120
	CG	+0.04	0.189	+0.02	0.556
	CA	-0.09	0.071	-0.03	0.705
		Global P = 0.179		Global P = 0.454	
DDAH2					
	CC	-0.00	0.858	**-0.03**	**0.045***
	CG	-	-	-	-
	AC	-	-	-	-
	AG	+0.00	0.858	**+0.03**	**0.045***

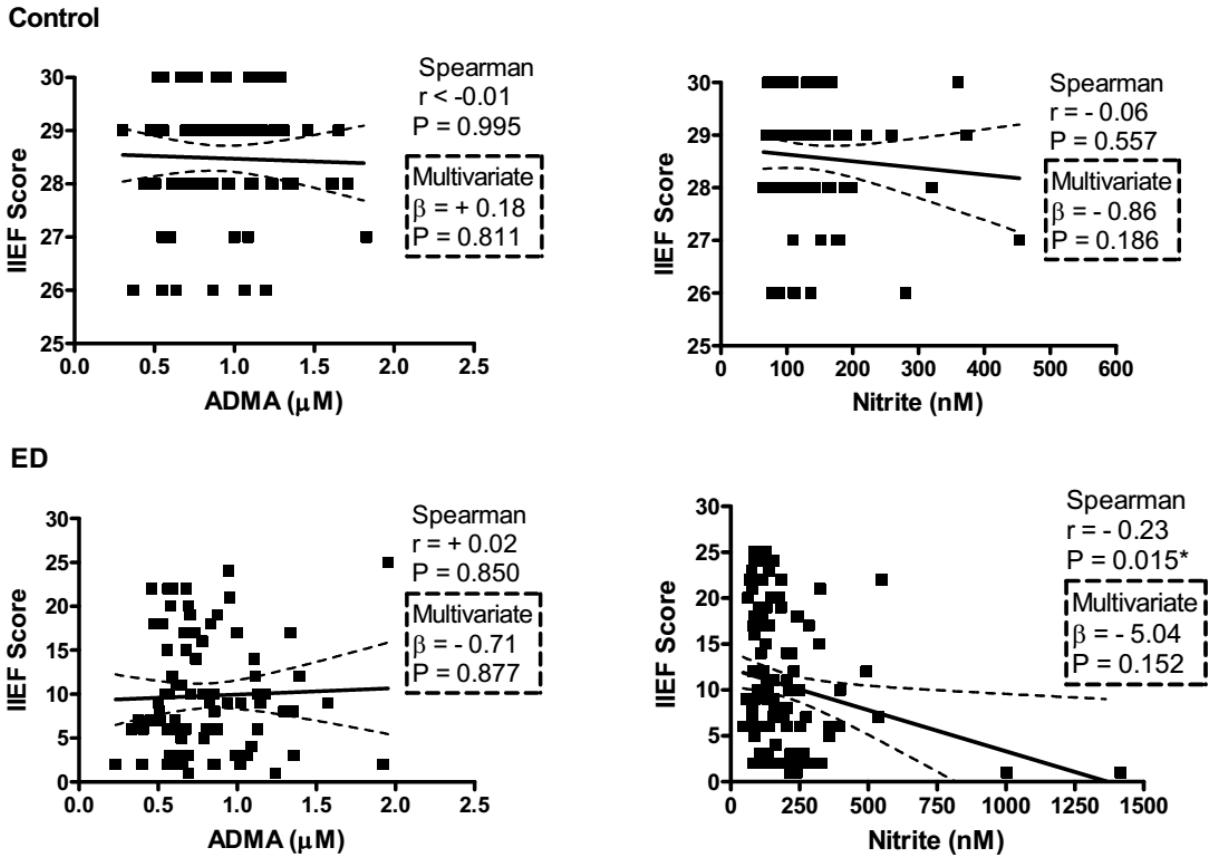
R^2, proportion of the variability explained by our model; RMSE, root mean square error.
Nitrite levels were log-transformed for this statistical analysis. Haplotypes CG and AC of *DDAH2* gene were excluded from statistical analysis since its frequencies were below 2%
* P <0.05 statistically significant.

Figure 1 – Correlation between ADMA and nitrite levels on plasma in Controls and ED groups



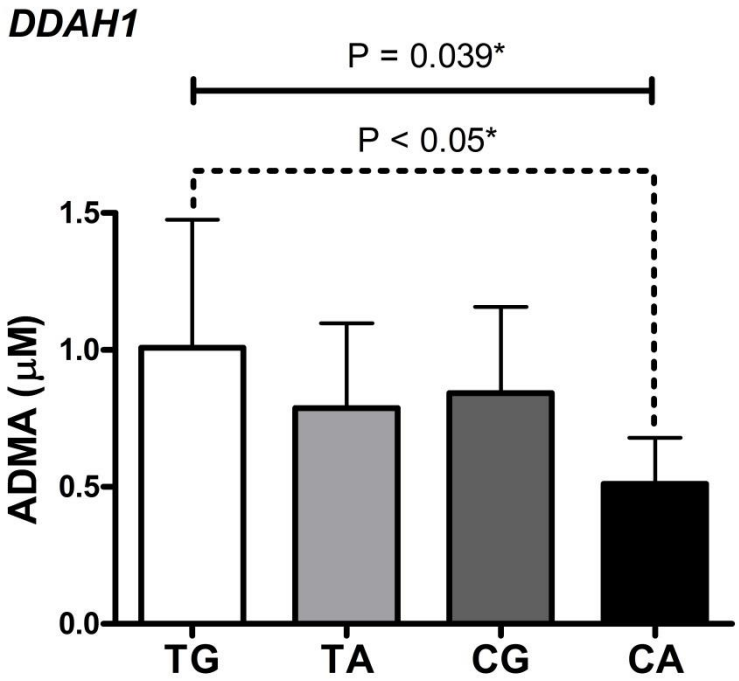
Dot plots represent crude data. Data was analyzed by Pearson's correlation or by Multivariate Linear Regression analysis (R^2= 0.03 for Control group and R^2=0.23 for ED group). Continuous line represents linear regression and dotted liner represent 95% confidence interval.
*: statistically significant.

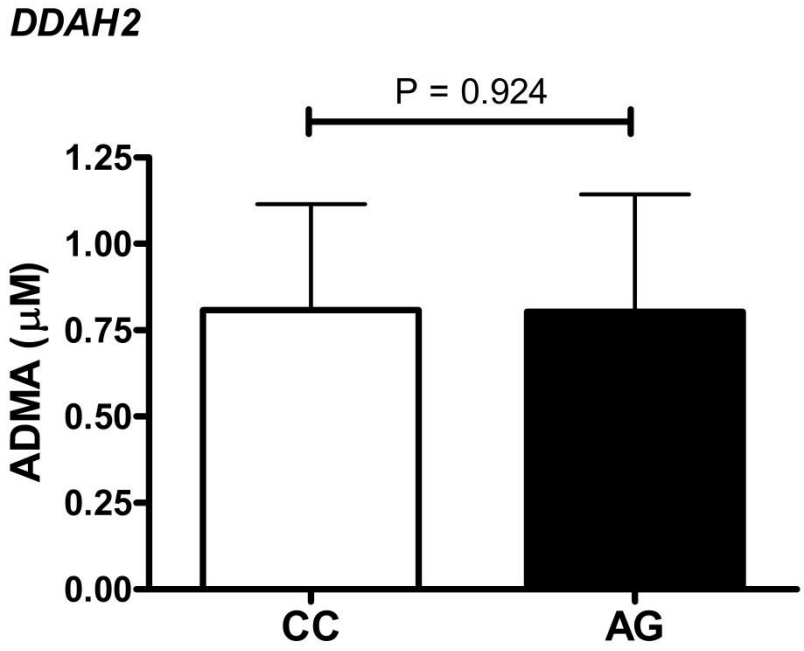
Figure 2 – Correlation between erectile function (IIEF score) and ADMA or nitrite levels on plasma in Controls and ED groups



Dot plots represent crude data. Crude data was analyzed by Spearman's correlation or log-transformed data was analyzed by a multivariate linear regression model (R^2= 0.12 for Control group; R^2= 0.16 for ED group). Continuous line represents linear regression and dotted liner represent 95% confidence interval.
*: statistically significant.

Figure 3 – Association analysis of *DDAH1* and *DDAH2* haplotypes with ADMA levels on ED





ADMA levels expressed as means ± standard deviation.
Haplotypes CG and AC of *DDAH2* gene were excluded from statistical analysis since its frequencies were below 2%* P <0.05 statistically significant.

HIGHLIGHTS

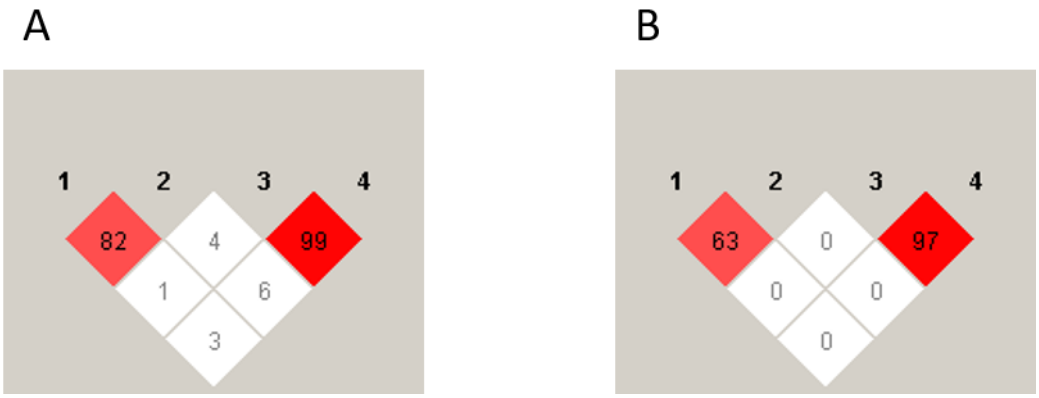
- ADMA and nitrite plasma levels are negatively associated when ED is present
- There is no association between ADMA and nitrite in healthy controls.
- Nitrite levels correlate negatively with Erectile function
- *DDAH1* and *DDAH2* polymorphisms were associated with changes in ADMA and Nitrite levels, but not with changes in erectile function, nor with ED risk

Supplementary Table 1 – Association analysis between *DDAH1* and *DDAH2* genotypes and erectile dysfunction

SNP	Genotype	Control (n = 98)	ED (n = 130)	Unadjusted P values	Unadjusted Odds Ratio (95% CI)	Adjusted P values	Adjusted Odds Ratio (95% CI)
DDAH1							
rs1554597	TT	40 (0.41)	60 (0.46)	-	1.00 (reference)	-	1.00 (reference)
	TC	46 (0.47)	52 (0.40)	0.325	0.75 (0.43 – 1.32)	0.217	0.46 (0.13 – 1.57)
	CC	12 (0.12)	18 (0.14)	1.000	1.00 (0.44 – 2.30)	0.993	1.01 (0.14 – 7.04)
		Global unadjusted P= 0.578					
		Global adjusted P= 0.332					
rs18582	GG	12 (0.12)	17 (0.13)	-	1.00 (reference)	-	1.00 (reference)
	GA	46 (0.47)	62 (0.48)	0.907	0.95 (0.41 – 2.19)	0.164	2.39 (0.71 – 8.41)
	AA	40 (0.41)	51 (0.39)	0.807	0.90 (0.39 – 2.10)	0.110	0.26 (0.05 – 1.31)
		Global unadjusted P = 0.965					
		Global adjusted P= 0.133					
DDAH2							
rs805304	CC	25 (0.26)	33 (0.25)	-	1.00 (reference)	-	1.00 (reference)
	CA	48 (0.49)	60 (0.46)	0.868	0.95 (0.50 – 1.80)	0.681	1.20 (0.51 – 2.82)
	AA	25 (0.25)	37 (0.29)	0.758	1.12 (0.54 – 2.32)	0.902	1.06 (0.40 – 2.82)
		Global unadjusted P = 0.872					
		Global adjusted P= 0.874					
rs805305[#]	CC	25 (0.26)	34 (0.26)	-	1.00 (reference)	-	1.00 (reference)
	CG	48 (0.49)	59 (0.45)	0.757	0.90 (0.48 – 1.72)	-	-
	GG	25 (0.25)	37 (0.29)	0.819	1.09 (0.53 – 2.25)	-	-
		Global unadjusted P = 0.843					

SNP, single nucleotide polymorphism; CI, confidence interval. Data reported as numbers (relative frequencies). [#] Due to a strong linkage disequilibrium we found among both *DDAH2* polymorphisms, we considered that there is no independence between these two variables, and therefore it was included in multivariate models only rs805304 and we considered it tagged for genotypes of the rs805305 polymorphism. Multivariate logistic regression models adjusted P values accounting for the influence of age, smoking status and diabetes. R^2=0.25.

Supplementary Figure 1 – Linkage analysis for the four studied polymorphisms

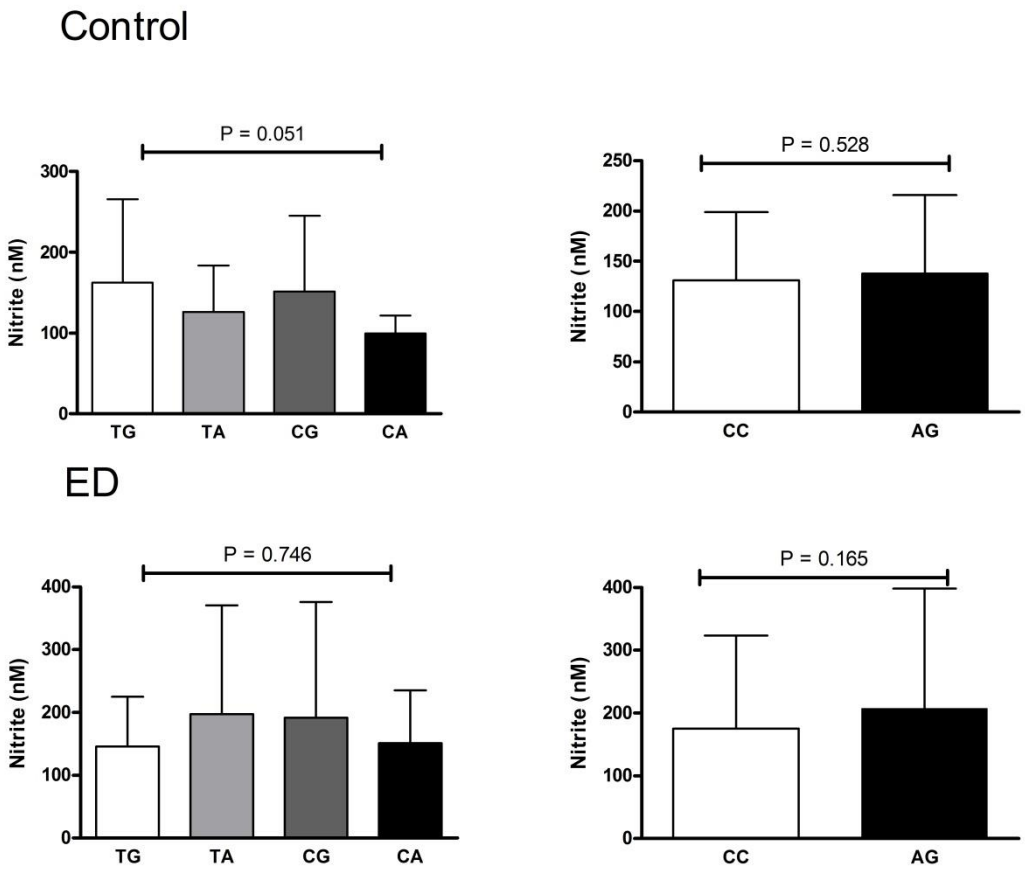


Each box contains the linkage analysis for each pair of the four polymorphisms. The white color represents no linkage, and shades of red represent low to high linkage. **"A":** D' values; **"B":** r^2 values. Polymorphisms are numbered as: 1) rs1554597, 2) rs18582; 3) rs805304 and 4) rs805305. *DDAH1* polymorphisms: 1 and 2; *DDAH2* polymorphisms: 3 and 4.

As expected, *DDAH1* and *DDAH2* markers are not in linkage disequilibrium between genes, but are in high linkage disequilibrium within genes.

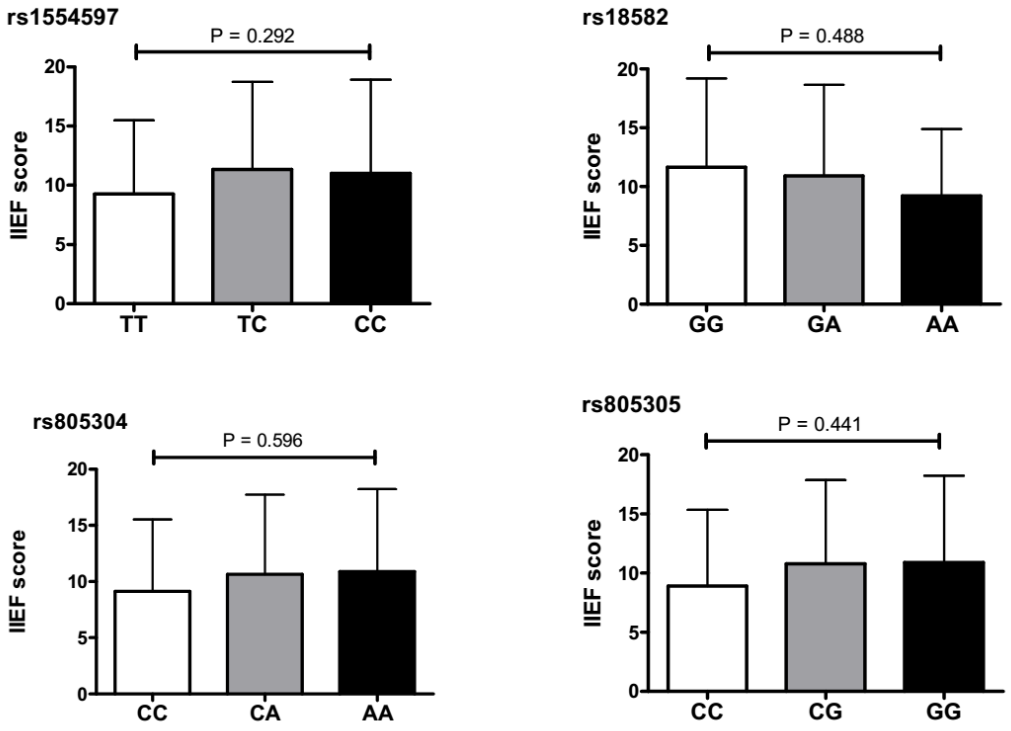
Of note, linkage of SNPs 3 and 4 is almost complete.

Supplementary Figure 2 – Association analysis of *DDAH1* and *DDAH2* haplotypes with nitrite levels on ED



Nitrite levels expressed as means ± standard deviation.
Haplotypes CG and AC of *DDAH2* gene were excluded from statistical analysis since its frequencies were below 2%* P <0.05 statistically significant.

Supplementary Figure 3 – Association analysis of *DDAH1* and *DDAH2* haplotypes with erectile function assessed by IIEF score on ED



EF scores expressed as means ± standard deviation.
* P <0.05 statistically significant.