UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
Departamento de Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas

GUILHERMO BRITES ANSELM

**O papel dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre o risco para
desenvolvimento de disfunção erétil.**

Ribeirão Preto
2018

GUILHERMO BRITES ANSELM

O papel dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre o risco para desenvolvimento de disfunção erétil.

Versão Original

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

Área de concentração: Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas

Orientador: Prof. Dr. Riccardo Lacchini

Ribeirão Preto

2018

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

Anselmi, Guilherme Brites

O papel dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre o risco para desenvolvimento de disfunção erétil.

97 f. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas.

Orientador: Lacchini, Riccardo.

1. Disfunção erétil. 2. Dimetilarginina assimétrica.
3. Polimorfismos genéticos. 4. Óxido Nítrico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANSELMÍ, G. B.

O papel dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre o risco para desenvolvimento de disfunção erétil.

Dissertação (Mestrado em Enfermagem Psiquiátrica) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a minha mãe e meu pai, Thania e José, meu irmão e minha cunhada, Franco e Camila, e toda a equipe do laboratório de Farmacogenética, que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha mãe e meu pai Thania e José, por todo o carinho e pelo apoio em todos os momentos.

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

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

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos por fornecer gentilmente materiais e equipamentos necessários para realização deste trabalho.

À aluna de doutorado Ana Maria Milanez Azevedo por sua contribuição nas análises de regressão linear e logística multivariadas, e também ensinamentos nos processos de genotipagem do laboratório.

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

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

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

RESUMO

ANSELM, G. B. **O papel dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre o risco para desenvolvimento de disfunção erétil.** 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem Psiquiátrica) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Uma das principais causas da disfunção erétil (DE) pode ser relacionada com o déficit de óxido nítrico (NO) no corpo humano. O principal componente para a produção do NO é o aminoácido L-arginina que é utilizado pelas enzimas óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS) para sua produção. A dimetilarginina assimétrica (ADMA) atua como inibidor endógeno dos três subtipos de NOS citadas acima e é metabolizada pelas enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1 e 2 (DDAH1 e DDAH2). Diversos estudos têm relacionado a alteração na expressão ou atividade das enzimas DDAH bem como alterações em seus genes, com distúrbios onde a sinalização de NO é prejudicada. Os objetivos deste estudo foram investigar a associação de variantes genéticas dos genes *DDAH1* (rs1554597 e rs18582) e *DDAH2* (rs805304 e 805305) com a predisposição à disfunção erétil (DE), scores de função erétil e concentrações plasmáticas de nitrito e ADMA. Também verificar se estes marcadores bioquímicos estão relacionados aos scores de função erétil. Foram selecionados 130 pacientes com DE clínica e 98 participantes controles saudáveis sem DE. A função erétil dos voluntários foi avaliada através do questionário Índice Internacional de Função Erétil (IIEF). Os genótipos dos rs1554597, rs805304 e rs805305 foram obtidos através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática, e do rs18582 apenas por técnica de PCR alelo específica. No grupo Pacientes, foram encontradas associações do gene *DDAH1* com as concentrações plasmáticas de ADMA: o rs1554597 teve os genótipos TT e TC associados positivamente (TT: β 0,13 e $P = 0,008$; TC: β 0,09 e $P = 0,016$;) e o genótipo CC associado negativamente (β -0,22 e $P < 0,001$); já o rs18582 teve o genótipo GG associado positivamente (β 0,22 e $P < 0,001$) e o genótipo AA associado negativamente (β -0,16 e $P = 0,001$); o haplótipo TG foi associado positivamente (β 0,12 e $P = 0,016$) e o haplótipo CA negativamente (β -0,18 e $P = 0,002$). Com relação ao nitrito, associações dos haplótipos do gene *DDAH2* foram encontradas, o haplótipo CC foi associado negativamente (β -0,03 e $P = 0,045$) e o haplótipo AG foi associado positivamente (β 0,03 e $P = 0,045$). O rs18582 teve o genótipo GG associado positivamente com as concentrações plasmáticas de nitrito, no modelo aditivo (β 0,15 e $P = 0,009$) e no modelo dominante (β 0,08 e $P = 0,009$), e os genótipos GA ou AA associados negativamente com as concentrações plasmáticas de nitrito, apenas no modelo dominante (β -0,08 e $P = 0,009$). Não foi encontrada nenhuma outra associação significativa no estudo.

Palavras-chave: Disfunção erétil. Dimetilarginina assimétrica. Polimorfismos genéticos. Óxido nítrico.

ABSTRACT

ANSELM, G. B. **The role of the *DDAH1* and *DDAH2* genes on the risk for developing erectile dysfunction.** 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem Psiquiátrica) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

One of the main causes for erectile dysfunction (ED) is related to nitric oxide (NO) deficiency in human body. The main substrate for NO synthesis is the amino acid L-arginine, which is processed by NO synthases (NOS) from three subtypes for its production: neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS). Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) acts as an endogenous inhibitor of the three subtypes of NOS and is metabolized by enzymes dimethylarginine dimethylaminohydrolase types 1 and 2 (DDAH1 and DDAH2). Several studies associate the altered expression or activity of DDAH enzymes, as well as their genes, with diseases with hampered NO signaling. The objectives of this study were to investigate the association of genetic variants of *DDAH1* (rs1554597 and rs18582) and *DDAH2* (rs805304 and 805305) with vulnerability to develop ED, with altered scores of erectile function and with altered plasma concentrations of nitrite and ADMA. We also investigated whether these biochemical markers associated with erectile function scores and ED risk. We selected 130 patients with clinical ED and 98 healthy controls without ED. Erectile function was assessed through the International Index for Erectile Function (IIEF) questionnaire. Genotypes for rs1554597, rs805304 and rs805305 were obtained with polymerase chain reaction (PCR) followed by enzyme restriction (RFLP), while rs18582 was determined using Allele-Specific oligonucleotide PCR (ASO-PCR). At patients group, we found association of variants in *DDAH1* gene with plasma ADMA levels: TT and TC genotypes of rs1554597 were associated with increases in ADMA (TT: β 0.13 e $P = 0.008$; TC: β 0.09 e $P = 0.016$); while CC genotype was associated with decreases in ADMA (β -0.22 e $P < 0.001$); regarding rs18582, GG genotype associated with increases in ADMA (β 0.22 e $P < 0.001$), while AA genotype associated negatively (β -0.16 e $P = 0.001$); besides, haplotype TG was also associated with ADMA increases (β 0.12 e $P = 0.016$), while CA haplotype associated negatively with ADMA levels (β -0.18 e $P = 0.002$). Regarding nitrite, associations of the haplotypes of the *DDAH2* gene were found, the haplotype CC was negatively associated (β -0.03 and $P = 0.045$) and the haplotype AG was positively associated (β 0.03 and $P = 0.045$). rs18582 had the GG genotype positively associated with plasma nitrite concentrations in the additive model (β 0.15 and $P = 0.009$) and in the dominant model (β 0.08 and $P = 0.009$), and negatively associated genotypes GA or AA with plasma nitrite concentrations, only in the dominant model (β -0.08 and $P = 0.009$). We found no further significant associations in our study.

Key-Words: Erectile dysfunction. Asymmetric dimethylarginine. Genetic polymorphisms. Nitric oxide.

RESUMEN

ANSELMÍ, G. B. **El papel de los genes DDAH1 y DDAH2 sobre el riesgo para el desarrollo de la disfunción eréctil**. 2018. 97 f. Disertación (Maestría en Enfermería Psiquiátrica) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Una de las principales causas de la disfunción eréctil (DE) puede estar relacionada con el déficit de óxido nítrico (NO) en el cuerpo humano. El principal componente para la producción del NO es el aminoácido L-arginina que es utilizado por las enzimas óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducida (iNOS) para su producción. La dimetilarginina asimétrica (ADMA) actúa como inhibidor endógeno de los tres subtipos de NOS citadas anteriormente y es metabolizada por las enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1 y 2 (DDAH1 y DDAH2). Diversos estudios han relacionado la alteración en la expresión o actividad de las enzimas DDAH así como alteraciones en sus genes, con disturbios donde la señal de NO es perjudicada. Los objetivos de este estudio fueron investigar la asociación de variantes genéticas de los genes DDAH1 (rs1554597 y rs18582) y DDAH2 (rs805304 y 805305) con la predisposición a la disfunción eréctil (DE), puntuaciones de función eréctil y concentraciones plasmáticas de nitrito y ADMA. También comprobar si estos marcadores bioquímicos están relacionados con las puntuaciones de función eréctil. Se seleccionaron 130 pacientes con DE clínica y 98 participantes controles sanos sin DE. La función eréctil de los voluntarios fue evaluada a través del cuestionario Índice Internacional de Función Eréctil (IIEF). Los genotipos de los rs1554597, rs805304 y rs805305 se obtuvieron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de la digestión enzimática, y del rs18582 sólo por técnica de PCR alelo específica. En el grupo Pacientes, se encontraron asociaciones del gen DDAH1 con las concentraciones plasmáticas de ADMA: el rs1554597 tuvo los genotipos TT y TC asociados positivamente (TT: β 0,13 y $P = 0,008$; TC: β 0,09 y $P = 0,016$; y el genotipo CC asociado negativamente (β -0,22 y $P < 0,001$); ya que el rs18582 tuvo el genotipo GG asociado positivamente (β 0,22 y $P < 0,001$) y el genotipo AA asociado negativamente (β -0,16 y $P = 0,001$); el haplotipo TG se asoció positivamente (β 0,12 y $P = 0,016$) y el haplotipo CA negativamente (β -0,18 y $P = 0,002$). En cuanto al nitrito, las asociaciones de los haplotipos del gen DDAH2 fueron encontradas, el haplotipo CC fue asociado negativamente (β -0,03 y $P = 0,045$) y el haplotipo AG fue asociado positivamente (β 0,03 y $P = 0,045$). rs18582 genotipo GG se asoció positivamente con las concentraciones plasmáticas de nitrito en el modelo aditivo (β 0,15 y $P = 0,009$) y el modelo dominante (β 0,08 y $P = 0,009$), y GA o genotipos AA negativos asociados con las concentraciones plasmáticas de nitrito, sólo en el modelo dominante (β -0,08 y $P = 0,009$). No se encontró ninguna otra asociación significativa en el estudio.

Palabras clave: Disfunción eréctil. Dimetilarginina asimétrica. Polimorfismos genéticos. Óxido nítrico.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Arginina e suas formas metiladas.....	23
Figura 2 – Mapa do gene <i>DDAH2</i>	27
Figura 3 – Genotipagem do rs1554597	37
Figura 4 – Genotipagem do rs18582	39
Figura 5 – Genotipagem do rs805304	41
Figura 6 – Genotipagem do rs805305	43
Figura 7 – Análise de correlação entre as concentrações plasmáticas de nitrito e ADMA nos grupos Pacientes e Controles	50
Figura 8 – Análise de correlação entre os scores FE e as concentrações plasmáticas de nitrito ou ADMA nos grupos Pacientes e Controles	51
Figura 9 – ADMA vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Controles	56
Figura 10 – ADMA vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Pacientes...	57
Figura 11 – ADMA vs haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> - grupo Controles...	61
Figura 12 – ADMA vs haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> - grupo Pacientes ..	62
Figura 13 – Nitrito vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Controles	64
Figura 14 – Nitrito vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Pacientes....	65
Figura 15 – Nitrito vs haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> - grupo Controles....	69
Figura 16 – Nitrito vs haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> - grupo Pacientes ...	70
Figura 17 – Score FE vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Pacientes	72
Figura 18 – Score FE vs haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> - grupo Pacientes	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do grau de DE segundo a pontuação no domínio função erétil do questionário IIEF	20
Tabela 2 – Evidências clínicas e funcionais dos polimorfismos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> selecionados para o estudo	27
Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados	49
Tabela 4 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos estudados entre os grupos Controles e Pacientes	53
Tabela 5 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> entre os grupos Controles e Pacientes	55
Tabela 6 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de ADMA nos grupos Controles e Pacientes.....	59
Tabela 7 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> sobre os valores de concentração plasmática de ADMA nos grupos Controles e Pacientes.....	63
Tabela 8 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de concentração plasmática de nitrito nos grupos Controles e Pacientes.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 9 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> sobre os valores de concentração plasmática de nitrito nos grupos Controles e Pacientes.....	71
Tabela 10 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de <i>score</i> FE no grupo Pacientes	74
Tabela 11 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i> sobre os valores de <i>score</i> FE no grupo Pacientes.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA – dimetilarginina assimétrica

DDAH – enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolase

DDAH1 – enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolase tipo 1

DDAH2 – enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolase tipo 2

DE – disfunção erétil

DEC – disfunção erétil clínica

DM – Diabetes mellitus

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – *deoxynucleotide solution mix*

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

LD – *Linkage Disequilibrium*

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MAF – *minor allele frequency*

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO – óxido nítrico

NOS – enzima óxido nítrico sintase

nNOS – enzima óxido nítrico sintase neuronal

OR – *odds ratio*

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PRMTs – *protein arginine methyltransferases*

score FE – pontuação no domínio função erétil do IIEF

SDMA – dimetilarginina simétrica

SNP – *single nucleotide polymorphism*

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

Teste χ^2 – teste do qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A disfunção erétil: definição, prevalência e classificação	18
1.2 Relação da disfunção erétil com o óxido nítrico	20
1.3 A dimetilarginina assimétrica (ADMA), sua metabolização e a relação com a disfunção erétil	23
1.4 Polimorfismos genéticos e haplótipos	25
1.5 Polimorfismos genéticos nos genes <i>DDAH1</i> e <i>DDAH2</i>	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos gerais	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Seleção dos participantes	33
3.2 Avaliação da função erétil	34
3.3 Análises laboratoriais	34
3.4 Extração de DNA genômico	34
3.5 Genotipagens	35
3.5.1 rs1554597 do gene <i>DDAH1</i> (T/C)	36
3.5.2 rs18582 do gene <i>DDAH1</i> (G/A)	38
3.5.3 rs805304 do gene <i>DDAH2</i> (C/A)	40
3.5.4 rs805305 do gene <i>DDAH2</i> (C/G)	42
3.6 Quantificação de ADMA	44
3.7 Quantificação de nitrito	44
3.8 Inferência de haplótipos e análises estatísticas	44
4 RESULTADOS	48
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	86

ANEXOS.....	98
ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	98
ANEXO B – Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE)	100
ANEXO C – Índice Internacional de Função Erétil (IIEF).....	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 A disfunção erétil: definição, prevalência e classificação

A função erétil normal pode ser compreendida como a capacidade do homem em manter a ereção peniana por tempo suficiente para permitir sua satisfação sexual e a penetração vaginal. A satisfação sexual é em grande parte responsável por reduzir o estresse, melhorar aspectos da vida pessoal em um relacionamento e também autoconfiança.

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de manter o pênis ereto para uma relação sexual satisfatória.¹ A disfunção sexual no homem pode incluir também além da dificuldade de ereção do pênis, fatores como a ejaculação anormal e a diminuição da libido.

O problema sexual mais comum no homem é a DE. Diversos estudos transversais e longitudinais sugerem uma alta prevalência de DE na população geral.^{2; 3; 4; 5; 6}

Um estudo multinacional em 27.839 homens de oito países (Estados Unidos, Reino Unido, Alemanha, França, Itália, Espanha, México e Brasil) foi realizado com o mesmo instrumento de pesquisa.⁷ As idades variaram de 20 a 75 anos e a prevalência geral de DE foi de 16%. Foi constatado também 8% em homens de 20 a 30 anos de idade e 37% em homens de 70 a 75 anos de idade.

Uma pesquisa de 1994 do *Massachusetts Male Aging Study* revelou que a DE surge como um problema comum em homens com 40 anos e aumenta com o avançar da idade. Aos 40 anos, por exemplo, 40% dos participantes reconheceram algum nível de comprometimento da função sexual e outros 10% reconheceram uma diminuição da proeza sexual ou interesse.⁴ Outro estudo longitudinal de nove anos do mesmo instituto confirmou os declínios associados à idade na maioria dos domínios da função sexual como: relação sexual, frequência de ereção, desejo sexual e satisfação com sexo e orgasmo.³

Também foi confirmada a alta prevalência de problemas sexuais por dados derivados do *National Health and Social Life Survey*,² no qual um grupo de jovens com idade entre 18 e 59 anos, 31% sofriam de disfunção sexual.

Cerca de 2% a 9% de homens com idade entre 40 e 49 anos apresentam DE, essa estatística aumenta ainda mais em homens com idade entre 60 e 69 onde essa prevalência sobe para 20% a 40% dos casos podendo variar de 50% a 100% em

homens com mais de 70 anos.^{8; 9} Existe uma série de mudanças associadas à idade na função sexual em homens, incluindo atraso na ereção, diminuição da intensidade e duração do orgasmo e diminuição da força de emissão seminal.¹⁰ A frequência de atividade sexual então diminui com a idade tanto em homens quanto em mulheres e os problemas sexuais tornam-se mais comuns com o envelhecimento.^{10; 11}

Um estudo mostrou que a prática de exercícios físicos está associado a um menor risco de disfunção erétil, enquanto a obesidade, tabagismo, o estilo de vida sedentário e a presença de comorbidades foram associadas a um maior risco.⁵ A menor prevalência de DE foi observada em homens sem problemas médicos crônicos que se adaptaram a comportamentos de vida mais saudáveis. Em homens obesos com DE, a perda de peso e o aumento da atividade física estão associados a uma melhora na função erétil em cerca de 1/3 dos pacientes.¹²

Quando falamos sobre a função sexual masculina, quatro fatores principais estão envolvidos neste processo: são as interações entre os sistemas vascular, neurológico, hormonal e psicológico. A DE então pode ser classificada como orgânica, psicogênica ou mista.^{9; 13} Quando falamos sobre as causas orgânicas da DE, as doenças vasculares se destacam, pois são cerca de 70% dos casos.¹⁴ A disfunção erétil de origem orgânica (vasculogênica) pode ser causada pelo mau funcionamento do mecanismo de vaso dilatação e sendo neste caso uma disfunção endotelial.¹⁵

A Disfunção Erétil e doenças vasculares geralmente coexistem¹⁶ e por conta disso a DE é atualmente utilizada para identificar doenças cardiovasculares silenciosas.^{14; 17} Além disso, homens que apresentam sintomas cardíacos e que possuem anomalias vasculares penianas possuem maior risco de ocorrência para acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio.¹³

Hipertensão arterial, hipogonadismo, hiperplasia benigna da próstata, uso de tabaco, disfunções endócrinas, Diabetes mellitus entre outros, podem ser considerados fatores de risco para a DE¹⁸ bem como o uso de algumas classes de medicamentos que são comumente prescritos, podem estar associados com o surgimento de DE.¹⁸

A DE masculina tem se tornado cada vez mais comum nos dias de hoje. Com o conhecimento da função sexual masculina normal e as causas de sua disfunção, tratamentos mais eficazes estão sendo disponibilizados.

O Índice Internacional de Função Erétil (IIEF) é um questionário que avalia aspectos da vida sexual de um paciente. Ele é composto por um conjunto de 15 questões que avaliam aspectos diferentes sobre a vida sexual do paciente. Neste instrumento, cada 5 questões avaliam um domínio de acordo com a somatória da pontuação, os domínios são: função erétil, função orgástica, desejo sexual, satisfação no intercurso e satisfação geral. Temos então que o presente teste foi desenvolvido com o objetivo de criar uma medida confiável e auto administrável da função erétil que fosse culturalmente válida e psicometricamente sólida com sensibilidade e especificidade para detectar alterações relacionadas ao diagnóstico e tratamento da disfunção erétil. Cada domínio possui uma pontuação que varia de 1 a 5, dependendo da resposta assinalada, e quanto menor a pontuação nos domínios do IIEF pior é a qualidade de vida sexual do paciente.^{19; 20}

O IIEF então é a medida diagnóstica da gravidade da DE utilizada por grande parte de médicos e pesquisadores para avaliar a eficácia e efetividade de intervenções em ensaios clínicos e terapêuticos e já foi validada em 32 línguas.^{19; 21} Desde então este instrumento tem sido adotado como a medida padrão-ouro e usado como desfecho primário em mais de 50 ensaios clínicos.²¹

Conforme apresentado na Tabela 1, Capelleri et al. descrevem a relação da pontuação obtida no domínio função erétil (FE) do IIEF com o grau de disfunção erétil de pacientes com vida sexual ativa.²²

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

Categoria	Pontuação
Severa	1 a 10
Moderada	11 a 16
Leve para Moderada	17 a 21
Leve	22 a 25
Sem disfunção erétil	26 a 30

Fonte: Azevedo (2017).

1.2 Relação da disfunção erétil com o óxido nítrico

A função sexual normal é descrita como um processo biopsicossocial, envolvendo a coordenação de sistemas psicológico, endócrino, vascular e neurológico.⁹

O órgão sexual masculino é constituído de tecidos eréteis chamados corpos cavernosos e um corpo esponjoso que suporta e delinea a uretra.¹³ Para que ocorra a atividade sexual masculina, a aquisição e a manutenção da ereção peniana, primeiramente ocorre um fenómeno vascular desencadeado por sinais neurológicos e facilitado na presença de um meio hormonal apropriado e mentalidade psicológica.

9

Basicamente as ereções psicogênicas são desencadeadas por impulsos neurais que acontecem em lugares específicos do sistema nervoso central e periférico.²³ Imagens sexuais podem se originar em resposta a estímulos eróticos auditivos ou visuais ou também serem gerados via fantasia. Este fenómeno sensorial é percebido e retransmitido por sinais neurais para um centro específico localizado no crânio e na região sacral, o centro de ereção crânio / sacral. A partir disso, os impulsos neurais fluem para o leito vascular pélvico, redirecionando o sangue para os corpos cavernosos. Agentes vasodilatadores são liberados nas terminações nervosas cavernosas que causam uma vasodilatação das arteríolas aferentes do pênis aumentando o fluxo sanguíneo; as células musculares lisas dos corpos cavernosos se relaxam; células endoteliais do corpo cavernoso liberam vasodilatadores capazes de manter esse fluxo; e o fluxo sanguíneo venoso peniano é obstruído, aumentando a pressão intra-cavernosa e levando o intumescimento do pênis.¹³

A ereção peniana, então, é um processo neurovascular muito complexo tendo início pela estimulação sexual que pode ser por fenómenos físicos e psicológicos e é mediado por substâncias que atuam no endotélio vascular. Os três principais fatores para a ereção peniana são: relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso, aumento do fluxo arterial peniano e a restrição do fluxo venoso de saída.

Um número significativo de casos de DE, psicogênica ou mista, estão envolvidas com fatores psicológicos. A ansiedade do desempenho na hora do ato sexual e o medo de falhar durante a relação são condições psicogênicas importantes relacionadas à DE. Aspectos psicológicos como o desenvolvimento interpessoal, cognitivo, afetivo, traumas, entre outros fatores, podem predispor os homens à DE.⁹ Doenças neurológicas como epilepsia, Parkinson, Alzheimer e lesão

da medula espinal estão frequentemente associadas à DE. Pacientes que foram submetidos a cirurgias radicais como prostatectomia possuem risco elevado de adquirir lesões nas estruturas que inervam o pênis e desenvolver DE. Atualmente os avanços nas técnicas cirúrgicas reduziram a incidência de DE pós-cirurgia pélvica.⁹

Altos níveis de óxido nítrico (NO) dentro do pênis atuam como um mediador químico local para facilitar o relaxamento das trabéculas intracavernosas, maximizando assim o fluxo sanguíneo e o enrijecimento do pênis. O NO é formado sob a influência da enzima óxido nítrico sintase, (NOS) que em conjunto com a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e oxigênio, transforma o substrato aminoácido L-arginina em citrulina e NO.¹³ O óxido nítrico é o principal agente relaxante vasoativo e é essencial para o controle da pressão arterial e para a fisiologia erétil. No pênis, o NO é produzido principalmente por duas isoformas de NO sintases, a endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS). Ambas são importantes para o início e manutenção da ereção peniana.²⁴

Os pré-requisitos para a atividade erétil do pênis são um influxo arterial adequado para fornecer uma fonte constante de oxigênio intracavernoso e NOS suficiente para gerar NO, que atua promovendo a geração de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). A perda da ereção acontece quando a vasodilatação induzida pelo óxido nítrico desaparece devido ao metabolismo do GMPc, que é primariamente mediado pela enzima fosfodiesterase tipo 5.

O papel do NO pode ter implicações terapêuticas importantes para pacientes com disfunção erétil, baixos níveis intracavernosos de NOS são encontrados em fumantes de cigarro, diabéticos e pacientes com deficiência de testosterona o que pode explicar porque esses fatores estão associados a uma alta frequência de DE. Exemplos incluem a diminuição do fluxo sanguíneo e níveis inadequados de oxigênio intracavernoso em casos de aterosclerose²⁵, e diabetes mellitus, que está associada à baixa atividade da enzima NOS.²⁶

A interferência com a entrega de oxigênio ou com síntese de NO (disfunção endotelial) pode impedir que a pressão arterial intracavernosa aumente em um nível suficiente para impedir o fluxo venoso, levado a uma incapacidade de adquirir ou manter uma ereção. A disfunção endotelial é definida pela incapacidade do endotélio de produzir relaxamento da musculatura lisa adjacente através do NO, sendo um fator comum entre diversas doenças cardiovasculares e a disfunção erétil. Várias evidências já nos mostraram relação entre a redução na produção de NO pelo

endotélio que levam à DE.²⁷ A disfunção erétil vasculogênica é causada pela incapacidade do relaxamento do músculo liso vascular e das demais estruturas do pênis, prevalecendo então os efeitos contráteis que deixam o órgão sexual masculino flácido.¹³

1.3 A dimetilarginina assimétrica (ADMA), sua metabolização e a relação com a disfunção erétil

ADMA (Figura 1) é um substrato formado após a proteólise de proteínas contendo resíduos de arginina metilados. O processo de metilação é denominado como a ligação ou substituição de um grupo metila sobre vários substratos. A ADMA age como um inibidor endógeno dos três subtipos de óxido nítrico sintase (NOS) a eNOS, nNOS e iNOS.^{28; 29} Maiores concentrações presentes de ADMA acarretam numa redução da produção de óxido nítrico pelas enzimas acima citadas, e está relacionada na patogênese de doenças cardiovasculares por conta da redução desta síntese.³⁰

Estudos nos mostram que existe o aumento dos níveis plasmáticos de ADMA em pacientes com doenças cardiovasculares.^{31; 32; 33; 34} Também foi comprovado que os níveis plasmáticos de ADMA podem prever eventos deletérios e mortalidade cardiovascular.²⁸ A ADMA surge a partir do processo de degradação (digestão) de proteínas por enzimas, denominadas proteases. As enzimas chamadas proteína-arginina metiltransferases (*protein arginine methyltransferases*, PRMTs) do tipo I atuam sobre resíduos de arginina modificando este aminoácido de uma forma pós-traducional através da metilação.^{28; 35}

Figura 1 – Arginina e suas formas metiladas

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

Várias proteínas diferentes são alvos das PRMTs, existindo pelo menos cinco PRMTs do tipo I capazes de gerar estas metilações que dão origem à ADMA.³⁵ Existe então uma complexidade no processo de formação deste substrato denominado ADMA, porém em contrapartida a ADMA é metabolizada através das enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1 e 2 (DDAH1 e DDAH2).³⁶

As enzimas DDAH1 e DDAH2 metabolizam a ADMA em citrulina e dimetilamina^{36; 37} e suas concentrações plasmáticas são mantidas pela degradação enzimática e pela excreção renal.^{38; 39}

As duas formas de dimetilarginina dimetilaminohidrolase possuem ampla distribuição nos tecidos, porém diferem quanto à localização. A DDAH2 pode ser encontrada principalmente do endotélio vascular, que expressa eNOS nos tecidos imunes (medula óssea, nódulos linfáticos, baço, entre outros), e também que expressam iNOS, na placenta, medula espinhal, no coração, rins e tecidos fetais.^{40; 41; 42} A DDAH1 pode ser encontrada principalmente no fígado e rins que são considerados os principais locais para o metabolismo da ADMA^{43; 44}, e também no cérebro, células endoteliais, células do musculo liso vascular, adipócitos e também em tecidos que expressam a nNOS.^{40; 41; 42; 45} Estudos também demonstraram que a expressão dessas enzimas ocorre no corpo cavernoso de ratos.^{46; 47; 48}

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) pode ser aumentado pela DDAH2, tendo um papel na promoção da angiogênese, mecanismo de

crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes.⁴⁹ Outros estudos a partir do silenciamento ou supressão de genes em roedores demonstraram que os níveis plasmáticos de ADMA são regulados pelas enzimas DDAH1, ao passo que a DDAH2 desempenha um papel importante na preservação da função endotelial nos vasos de resistência e parece ser necessária para a vasodilatação dependente de acetilcolina.^{16; 41; 50; 51} Uma forma então de melhorar a saúde vascular, é a ação terapêutica com alvo na atividade da expressão destas enzimas.^{52; 53}

Inibidores endógenos da NOS, como a ADMA e outros, podem ser um fator importante na diminuição da produção de óxido nítrico.^{46; 54; 55} Várias desordens associadas a disfunção da NOS estão associados a elevados níveis de ADMA, tais como DE arteriogênica,⁵⁶ diabetes tipo 1 não complicada,⁵⁷ hipertensão,⁵⁸ hipertensão pulmonar,⁵⁹ entre outros.

São complexas as diversas vias de síntese de ADMA, porém existe um pequeno número de proteínas capaz de controlar e eliminar tal substrato. Como já citado a ADMA é metabolizada pelas duas isoformas da enzima DDAH,^{37; 42} e é possível que fatores que alteram a atividade ou a expressão de tais enzimas estejam associados à disfunção erétil.

Considerando que o NO tem sido mostrado com o principal fator para o relaxamento do musculo liso cavernoso e da ereção peniana, a hipótese do parágrafo anterior torna-se plausível.^{60; 61; 62; 63} Um estudo demonstrou a relação entre a fumaça de cigarro com a redução da expressão da enzima DDAH1 no tecido cavernoso de coelhos, aumentando as concentrações de ADMA e prejudicando a função erétil.⁴⁶ É comprovado também, que níveis aumentados de ADMA estão presentes em pacientes com DE, principalmente nos casos de etiologia vascular.⁵⁶ As concentrações plasmáticas de ADMA nestes pacientes se correlacionaram inversamente à pontuação da função erétil determinados pelo IIEF.⁵⁶ Fatores de risco cardiovasculares foram relacionados com as concentrações circulantes de ADMA em pacientes com DE.⁶⁴

Estudos já foram realizados, em modelos animais e humanos, demonstrando alterações na expressão e/ou atividade das enzimas DDAHs em doenças nas quais a sinalização comprometida de NO tem sido implicada na fisiopatologia.^{65; 66; 67}

1.4 Polimorfismos genéticos e haplótipos

O ácido desoxirribonucleico (DNA) pode apresentar mutações que levam a variação genética em todo o genoma humano. Essas variações podem ser transmitidas através de gerações, caso não resultem em graves alterações. Quando a frequência de uma variante atinge mais de 1% em uma população é denominada polimorfismo. Atualmente existem alguns tipos de polimorfismos diferentes, os mais estudados são inserções/deleções, variantes de número de cópias e por fim os polimorfismos de base única ou *nucleotide polymorphisms* (SNPs). Os SNPs possuem duas ou mais alternativas denominadas alelos em um locus específico de um gene. *Minor allele frequency* (MAF) é o nome dado a frequência do alelo menos frequente de um SNP em uma população.⁶⁸

Haplótipos são diferentes polimorfismos em um mesmo cromossomo que podem ser herdados em conjuntos, cada haplótipo combina diferentes alelos destes diferentes polimorfismos. O material genético passa dos pais para os filhos englobando não apenas a combinação de haplótipos mas também o processo de recombinação, onde um cromossomo de um genitor troca parte de seu material genético com outro cromossomo do mesmo genitor, essa transmissão dos haplótipos de pais para filhos ocorre de forma não óbvia. No cromossomo, existem regiões que o processo de recombinação ocorre mais favoravelmente e com mais frequência, e também existem outras regiões que a recombinação acontece raramente, formando blocos onde existe com maior certeza, a passagem de toda uma combinação de alelos de polimorfismos próximos de pais para filhos. Esse conceito é denominado de bloco de haplótipos. Outra propriedade importante é chamada de desequilíbrio de ligação (*Linkage Disequilibrium*, LD), onde existe a associação não-aleatória de alelos em dois ou mais *loci*, não necessariamente no mesmo cromossomo. Com isto, podemos prever o genótipo de outro SNP se a associação do LD for alta entre estes dois polimorfismos. O LD descreve uma situação em que algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem com maior ou menor frequência numa população.⁶⁹

1.5 Polimorfismos genéticos nos genes *DDAH1* e *DDAH2*

A enzima DDAH1 é “produzida” através do gene *DDAH1*, que fica localizado no braço curto do cromossomo 1 (região 1p22). A enzima DDAH2 é codificada pelo gene *DDAH2* (Figura 2), localizado no braço curto do cromossomo 6 (região 6p21.3).⁷⁰

Figura 2 – Mapa do gene *DDAH2*

Esquema que exemplifica a estrutura do gene *DDAH2*, sendo os introns representados pelas linhas e os exons pelas caixas. As setas indicam a posição dos polimorfismos selecionados para este estudo. Fonte: Azevedo (2017).

Polimorfismos nos genes *DDAH1* e *DDAH2* são capazes de alterar os níveis plasmáticos de ADMA, ^{71; 72; 73} estes níveis quando aumentados, proporcionam um risco maior para desfecho cardiovasculares ^{74; 75; 76}. Para este estudo foram selecionados dois polimorfismos do gene *DDAH1* (rs1554597 e rs18582) e dois do gene *DDAH2* (rs805304 e rs805305), que estão associados a alterações nas concentrações circulantes de ADMA. Em um estudo prévio, foi demonstrado que os polimorfismos rs1554597 e rs18582 podem alterar as concentrações plasmáticas de ADMA em pacientes com DE de perfil vasculogênico e que os polimorfismos rs805304 e rs805305 estão associados a alterações na resposta ao tratamento com sildenafil de pacientes com DE decorrente de prostatectomia. Portanto, estes polimorfismos podem ser considerados bons candidatos para a investigação da predisposição à DE. ²⁴ A frequência dos polimorfismos selecionados é relativamente alta (acima de 27%, Tabela 2), o que nos permite fazer análises de associação sem necessitar de um grande número de pacientes.

Na literatura atual, ainda não existem estudos que investiguem se bases genéticas relacionadas ao metabolismo do ADMA estão associadas ao risco para DE. Considerando a enorme relevância do ADMA sobre a produção de NO, o principal mediador envolvido no processo da ereção peniana, é provável que SNPs que modifiquem a atividade das enzimas DDAHs possuam impacto real sobre o surgimento da disfunção erétil, sendo este o principal objeto de estudo do presente trabalho.

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

SNP	Alelos (MAF)	Localização no gene	Fenótipos associados
-----	--------------	---------------------	----------------------

DDAH1

rs1554597	T/C (C=0.41)	Intron 1	<ul style="list-style-type: none"> • Pessoas com o alelo C têm maiores concentrações circulantes de ADMA.^{72; 77}
rs18582	G/A (G=0.40)	Intron 1	<ul style="list-style-type: none"> • Genótipo GG associado a maior concentração plasmática de ADMA;^{77; 78} está em LD ($r^2 < 0,88$) com os outros polimorfismos associados à ADMA.⁷⁷

DDAH2

rs805304	C/A (C=0.27)	Região promotora	<ul style="list-style-type: none"> • Polimorfismo associado com hipertensão,⁷⁹ e risco cardiovascular;^{80; 81} portadores do alelo C têm maior concentração circulante de ADMA.⁸²
rs805305	C/G (C=0.32)	Intron 2	<ul style="list-style-type: none"> • SNP associado a doença cardiovascular,⁸⁰ hemorragia cerebral⁸³ e hipertensão;⁷⁹ alelo G associado a alterações da concentração plasmática de ADMA.^{84; 85; 86}

SNP, *single nucleotide polymorphism*; MAF, *minor allele frequency* – dados obtidos a partir da plataforma dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) usando a população CEU (caucasianos). Fonte: Azevedo (2017).

O NO é o principal responsável pelo relaxamento do músculo liso envolvido na ereção peniana. A ADMA é uma molécula que possui a capacidade de inibir a síntese de NO e pode causar DE em modelos animais. As principais enzimas responsáveis pela metabolização de ADMA dentro das células são a DDAH1 e a DDAH2. Polimorfismos genéticos podem alterar a funcionalidade e a capacidade de metabolização destas enzimas fazendo com que haja uma mudança na concentração de ADMA intracelular e consequentemente uma alteração na produção de NO.

Desta forma, a hipótese do presente estudo é que polimorfismos genéticos dos genes *DDAH1* (rs1554597 e rs18582) e *DDAH2* (rs805304 e rs805305) estejam associados com o risco para DE, sendo que portadores dos alelos relacionados a menores concentrações plasmáticas de ADMA (i.e., T do rs1554597, A do rs18582, A do rs805304 e G do rs805305) apresentem menor risco para DE, melhor função erétil avaliada pelo IIEF, menores concentrações plasmáticas de ADMA e maiores concentrações plasmáticas de nitrito.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar a associação de variantes genéticas com a predisposição à disfunção erétil, diferenças no grau de função erétil, e influência sobre marcadores bioquímicos. Ainda, verificar se estes marcadores bioquímicos estão relacionados a alterações na função erétil.

2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar se polimorfismos dos genes *DDAH1* (rs1554597 e rs18582) e *DDAH2* (rs805304 e rs805305) estão associados com o risco para DE, diferenças nas pontuações do domínio FE do IIEF e as concentrações plasmáticas de ADMA e nitrito;
- b) Investigar se haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* (que incluem os polimorfismos acima mencionados) estão associados com o risco para DE, diferenças nas pontuações do domínio FE do IIEF e as concentrações plasmáticas de ADMA e nitrito;
- c) Verificar a relação entre as concentrações plasmáticas de ADMA e diferenças nas pontuações do domínio FE do IIEF;
- d) Verificar a relação entre as concentrações plasmáticas de nitrito e diferenças nas pontuações do domínio FE do IIEF.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção dos participantes

Para este estudo, foram selecionados 228 participantes, sendo 130 com DE clínica (DEC), do Ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP), sob a coordenação do Prof. Dr. Sílvio Tucci Junior da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e 98 participantes controles saudáveis sem DE. Os participantes controles foram abordados dentro do campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto e convidados a participar da pesquisa de forma voluntária.

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EERP-USP) (número do processo: 51399015.3.0000.5393).

Os critérios de inclusão do grupo paciente no estudo foram: idade entre 18 e 80 anos; queixas envolvendo a atividade sexual; diagnóstico médico de DE; e resultado do questionário IIEF com pontuação < 26 no domínio FE. Já os critérios de exclusão foram: presença de hipogonadismo; hipotireoidismos; bexiga neurogênica; ejaculação precoce; implantes penianos; acidentes cerebrovasculares; traumas no sistema nervoso central; e anormalidades anatômicas, como a doença de Peyronie. Os pacientes que foram submetidos à prostatectomia foram excluídos.

Os critérios de inclusão do grupo controle no estudo foram: idade entre 18 e 80 anos; não possuir diagnóstico médico de DE; e resultado do questionário IIEF com pontuação ≥ 26 no domínio FE. Os critérios de exclusão para o grupo controle foram os mesmos apresentados do grupo paciente acima.

Os pacientes seguiram o esquema diagnóstico e terapêutico da rotina habitual de manejo clínico empregada no Ambulatório de Urologia do HCFMRP. Cada voluntário assinou um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após a assinatura do TCLE, o paciente permaneceu em repouso por cerca de 20 minutos e, então, sua pressão arterial foi aferida três vezes, obtendo-se um valor médio das três aferições para as pressões arteriais sistólica e diastólica. Em seguida, foi aplicado o questionário traduzido do IIEF¹⁹ e coletado sangue por punção venosa em tubos a vácuo de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), gel e heparina de sódio, utilizando procedimentos adequados, para obtenção de sangue total, soro e

plasma. As amostras foram armazenadas em freezers - 20 °C (sangue total) e - 80 °C (soro e plasma). Os mesmos procedimentos de coleta e armazenamento foram realizados no grupo controle.

3.2 Avaliação da função erétil

A função erétil de pacientes e controles foi avaliada pela pontuação no domínio FE do IIEF (*score FE*). Este domínio é composto pelas perguntas de número 1 a 5 e a questão número 15 (anexo C) do questionário. Neste domínio, pode-se atingir uma pontuação que variar de 0 a 30 pontos, a qual é utilizada para classificar o grau de DE dos indivíduos (tabela 1; item 1.1).

3.3 Análises laboratoriais

A partir das amostras de sangue dos pacientes, foram utilizados kits comercialmente disponíveis (Lab Test, Brasil) com técnicas padronizadas para dosagem de lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol total, triglicérides, uréia, creatinina e níveis de glicemia de jejum. A concentração de lipoproteína de baixa densidade foi calculada de acordo com a fórmula Friedwald's.

3.4 Extração de DNA genômico

A partir de 500 µL de sangue total das amostras dos pacientes, foram feitas as extrações do DNA genômico. Foi acrescentado ao sangue 1,5 mL de solução A (Triton X 1%, MgCl₂ 5 mM, sacarose 0,32 M e Tris-HCl 10 mM pH 8), seguido por homogeneização e incubação em gelo por 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram completados com solução A, homogeneizados e centrifugados novamente. Estes passos foram repetidos 4 vezes ou mais, até o sobrenadante ficar límpido e obterem-se *pellets* (leucócitos), que possuem uma cor branca, dentro dos tubos. Nos *pellets* foram adicionados 100 µL de solução B 2X (Na₂EDTA 20 mM, NaCl 20 mM e Tris-HCl 20 mM) e 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). Após esse

procedimento os tubos foram deixados em repouso em banho-maria à 37°C *overnight*.

Após o *overnight*, foram adicionados aos tubos 50 µL de tris-ácido etileno diamino tetra acético (TE) e 300 µL de fenol, com posterior homogeneização por inversão durante 5 minutos, centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C, e coleta da fase superior (aquosa) de cada amostra, que foi transferida para novo tubo. Aos novos tubos foram adicionados 150 µL de fenol e 150 µL de solução clorofórmio / álcool isoamílico (24:1), seguindo os mesmos passos da etapa anterior descrita acima. Seguiu-se com adição de 300 µL de solução clorofórmio / álcool isoamílico (24:1) e, novamente, os passos de homogeneização, centrifugação e transferência da fase aquosa das amostras para novos tubos. Após, observou-se o volume obtido de fase aquosa para cada amostra e adicionou-se 1/10 deste volume de acetato de sódio 3 M pH 5,4 e duas vezes o volume de etanol absoluto gelado (-20°C) em cada tubo, que foram armazenados em freezer a -20°C por 2 horas.

Em sequência, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos em 14.000g a 4°C e os sobrenadantes foram descartados. Adicionou-se 500 µL de etanol 70% gelado, com posterior agitação e centrifugação (15 minutos em 14.000g a 4°C) e, em seguida, 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. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso no banho-maria à 37 °C *overnight*.

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

O nome do processo utilizado para a extração do dna genômico que foi descrito neste tópico é *salting-out*.

3.5 Genotipagens

Os quatro SNPs foram genotipados através de técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida ou não de digestão enzimática, que foram

padronizadas em nosso laboratório conforme protocolo previamente descrito.⁶⁹ Para o desenho dos *primers* das PCRs de cada polimorfismo foram utilizados a ferramenta Primer-BLAST da NCBI e o *software* Gene Runner 5.0. Posteriormente, os *primers* foram sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich®.⁶⁹ Os resultados das genotipagens foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com GelRed™, aplicando-se 3 µL da solução de cada PCR por poço. O tempo de corrida de cada eletroforese foi de 1 hora e 30 minutos a 150 W, 300 V e 100 mA. Os produtos das digestões enzimáticas (fragmentos de DNA) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3%, também preparado com GelRed™. Foram aplicados 10 µL de cada produto digerido por poço. O tempo de corrida da eletroforese foi de 1 hora e 30 minutos a 150 W, 300 V e 150 mA. A seguir, descrevem-se as particularidades das técnicas utilizadas nas genotipagens de cada SNP.

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

Este SNP foi genotipado por PCR seguida de digestão enzimática. O par de *primers* utilizados nesta PCR foi desenhado conforme:

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

Foi utilizada uma solução para esta PCR com o volume final de 15 µL para cada amostra, contendo: tampão 1X; cloreto de magnésio 1,5 mM; *deoxynucleotide solution mix* (dNTP) 0,2 mM; *primers forward* e *reverse* 0,1 µM cada; 0,5 U de enzima Taq polimerase; e 40 ng de DNA genômico. O produto de interesse amplificado nesta reação é de 300 pares de base (pb) (Figura 3A). No processo de digestão enzimática foi preparada uma solução com volume final de 10 µL por amostra, contendo: tampão 1X; 1 U da enzima de restrição Hpy188III (BioLabs Inc.); e 1 µg do produto da PCR. Após este processo, as digestões foram incubadas a 37 °C por uma hora e meia, com posterior aquecimento a 65°C por 20 minutos para inativação da enzima. A enzima corta o produto da PCR que contém o alelo C em dois fragmentos de 210 pares de base e 90 pares de base. O produto da PCR contendo o alelo T não é cortado pela enzima, ficando com seu tamanho original de 300 pares de base (Figura 3B).

Figura 3 – Genotipagem do rs1554597

A) Produtos da PCR possuem tamanho de 300 pb. **B)** Produtos da digestão enzimática – a banda de 300 pb indica presença do alelo T e a banda de 210 pb indica a presença do alelo C – em branco são apresentados os genótipos de controles positivos e em amarelo as amostras de pacientes. B, branco da PCR; L, *ladder* (padrão de peso molecular); pb, pares de base; TT, genótipo homozigoto ancestral; TC, genótipo heterozigoto; CC, genótipo homozigoto variante. Fonte: Azevedo (2017).

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

A genotipagem deste SNP foi feita apenas pela técnica de PCR alelo específica. Os *primers* utilizados nessa PCR foram desenhados conforme:

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

Nesta reação de PCR, foram preparadas duas soluções com volume de 15 µL cada, sendo uma para a PCR específica do alelo A e outra para a PCR específica do alelo G, contendo: tampão 1X; cloreto de magnésio 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; *primer forward* específico A ou G 0,3 µM; *primer reverse* 0,3 µM; *primer forward* controle 0,047 µM; 0,5 U de enzima Taq polimerase; e 20 ng de DNA genômico. As reações de PCR para os alelos A e G de cada paciente ocorreram ao mesmo tempo no termociclador. Em ambas as PCRs (A e G) sempre é amplificado um produto que serve como controle positivo, o qual é delimitado pelo *primer reverse* e pelo *primer forward* controle e tem 677 pb. Um segundo produto de 135 pb, que é delimitado pelo *primer reverse* e pelo *primer forward* específico (A ou G), deve ser amplificado em apenas uma ou em ambas as reações, determinando assim a presença do alelo. Sendo assim, pacientes que possuem o genótipo GA, apresentam este produto nas duas reações; pacientes com o genótipo GG apresentam este produto apenas na reação específica do alelo G; e pacientes que possuem genótipo AA apresentam este produto apenas a reação específica do alelo A (Figura 4).

Figura 4 – Genotipagem do rs18582

Produtos da PCR alelo específica – a banda de 677 pb indica o funcionamento da PCR (controle interno). A banda de 135 pb indica a presença do produto alelo específico – na figura, as letras em azul claro indicam a ordem de aplicação da PCR específica de cada alelo, colchetes em branco apresentam os genótipos de controles positivos, colchetes em amarelo as amostras de pacientes. B, branco da PCR; L, *ladder* (padrão de peso molecular); pb, pares de base; GG, genótipo homozigoto ancestral; AG, genótipo heterozigoto; AA, genótipo homozigoto variante. Fonte: Azevedo (2017).

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

Este SNP foi genotipado por PCR seguida de digestão enzimática. O par de *primers* utilizados nesta PCR foi desenhado conforme:

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

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

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

Figura 5 – Genotipagem do rs805304

A) Produtos da PCR com tamanho de 239 pb. **B)** Produtos da digestão enzimática – a banda de 239 pb indica presença do alelo A e a banda de 176 pb a presença do alelo C – em branco são apresentados os genótipos de controles positivos e em amarelo as amostras de pacientes. B, branco da PCR; L, *ladder* (padrão de peso molecular); pb, pares de base; CC, genótipo homozigoto ancestral; CA, genótipo heterozigoto; AA, genótipo homozigoto variante. Fonte: Azevedo (2017).

3.5.4 rs805305 do gene DDAH2 (C/G)

Este SNP foi genotipado por PCR seguida de digestão enzimática. O par de *primers* utilizados nesta PCR foi desenhado conforme:

- *Primer forward*: 5'-AAGAGGAGCCTGAGGAACAA-3'; e
- *Primer reverse*: 5'-GCGGAGAGAGGATGCTTAAC-3'.

As reações de PCR do rs805305 seguiram as mesmas condições descritas para o rs805304. O produto de interesse amplificado nesta reação é de 340 pb (Figura 6A).

A digestão enzimática foi preparada com uma solução contendo volume final de 10 µL por amostra que possuía: tampão 1X; 2U da enzima BstUI; e 1 µg do produto de PCR. As digestões foram feitas com incubação a 60 °C por uma hora e meia. A enzima BstUI cliva o produto da PCR que contém o alelo G em dois fragmentos de 190 pb e 150 pb. O produto da PCR contendo o alelo C não é clivado pela enzima, mantendo seu tamanho de 340 pb (Figura 6B).

Figura 6 – Genotipagem do rs805305

A) Produtos da PCR com tamanho de 340 pb. **B)** Produtos da digestão enzimática – a banda de 340 pb indica presença do alelo C, as bandas de 190 pb e 150 pb indicam a presença do alelo G – em branco são apresentados os genótipos de controles positivos e em amarelo as amostras de pacientes. B, branco da PCR; L, *ladder* (padrão de peso molecular); pb, pares de base; CC, genótipo homozigoto ancestral; CG, genótipo heterozigoto; GG, genótipo homozigoto variante. Fonte: Azevedo (2017).

3.6 Quantificação de ADMA

A dimetilarginina assimétrica foi quantificada utilizando um kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) de princípio competitivo da Elabscience (cat# E-EL-0042, Wuhan, China), seguindo as instruções do fabricante, conforme descrito em estudo prévio.²⁴ A absorbância foi medida a 450 nm usando um espectrofotômetro de placa μ Quant (BioTek, Winooski, EUA). Foram utilizadas amostras diluídas de plasma EDTA (1:10, v / v) e as curvas padrão foram ajustadas usando um modelo de 4 parâmetros por meio de uma ferramenta online disponível gratuitamente (www.elisaanalysis.com).

3.7 Quantificação de nitrito

O nitrito foi quantificado em amostras de plasma heparina, conforme descrito em estudos prévios.^{24; 87} Resumidamente, 300 μ L de amostras de plasma foram injetados em uma câmara preenchida com 8 mL de solução de triiodeto acidificada, a qual é borbulhada por fluxo constante de nitrogênio e conectada a um analisador de óxido nítrico (Sievers 280i Boulder, CO, EUA). O nitrito no plasma reage com a solução de triiodeto formando gás NO, que é transportado pelo fluxo de nitrogênio para uma câmara do aparelho, onde o NO entra em contato com ozônio, gerando uma reação quimioluminescente que é detectada e quantificada pelo analisador.

3.8 Inferência de haplótipos e análises estatísticas

A inferência dos haplótipos de cada gene estudado foi realizada pelo programa PHASE 2.1. Para os dois SNPs do *DDAH1*, os possíveis haplótipos foram: TG, TA, CG e CA. Para os dois SNPs do *DDAH2*, os possíveis haplótipos foram: CC, CG, AC e AG. Haplótipos com frequência <2% nos dois grupos foram excluídos das análises estatísticas.

A análise estatística não corrigida compreendeu a comparação das variáveis categóricas pelo teste qui-quadrado (características clínicas dos grupos; distribuições genéticas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg; frequências dos genótipos nos modelos de herança aditivo, dominante e recessivo dos polimorfismos estudados entre os grupos; e frequências dos haplótipos de cada gene estudado

entre os grupos). Quando uma variável categórica com dois níveis foi comparada a uma variável quantitativa, usamos o teste T de Student para variáveis contínuas paramétricas (características clínicas e laboratoriais entre os grupos; concentrações plasmáticas de ADMA e nitrito entre os genótipos nos modelos dominante e recessivo e entre os haplótipos do gene *DDAH2*) ou o teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas (*scores* FE entre os genótipos nos modelos dominante e recessivo e entre os haplótipos do gene *DDAH2*). Quando variáveis categóricas com três ou mais níveis foram comparadas a uma variável quantitativa, utilizou-se ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para variáveis contínuas paramétricas (concentrações plasmáticas de ADMA e nitrito entre os genótipos no modelo aditivo e entre os haplótipos do gene *DDAH1*) ou de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para variáveis não paramétricas (*scores* FE entre os genótipos no modelo aditivo e entre os haplótipos do gene *DDAH1*). As correlações de duas variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste de correlação de Pearson para variáveis contínuas paramétricas (concentrações plasmáticas de nitrito *versus* concentrações plasmáticas de ADMA) ou teste de correlação de Spearman para variáveis não paramétricas (*scores* FE *versus* concentrações plasmáticas de ADMA ou nitrito). Além disso, foram realizados modelos estatísticos corrigidos por fatores de confusão, utilizando o programa JMP 5.1.2 (SAS Institute). Modelos multivariados foram construídos por meio de uma análise sequencial de cada variável independente, avaliando se estavam associados a cada variável dependente. Além disso, também foi realizada uma análise bivariada para avaliar o potencial de confusão de cada variável independente na relação entre os genótipos (nos modelos aditivo, dominante e recessivo), haplótipos, concentrações plasmáticas de ADMA e nitrito com as variáveis dependentes. Na análise multivariada, a fim de obter uma distribuição normal, as concentrações plasmáticas de ADMA foram transformadas logaritmicamente. O modelo final selecionado foi com o maior R^2 e menor erro quadrático médio possível. As variáveis independentes incluídas em todos os modelos finais foram idade, diabetes e tabagismo. Alguns modelos incluíram genótipos, haplótipos ou concentrações plasmáticas de ADMA (transformadas logaritmicamente) e nitrito como variáveis independentes. Para as análises de regressão linear multivariada, as variáveis dependentes foram as concentrações plasmáticas de ADMA (transformadas logaritmicamente) e nitrito ou os *scores* FE. Para a regressão logística multivariada, a inclusão dos voluntários no grupo

Pacientes ou Controles foi considerada como variável dependente. Foi observado um forte desequilíbrio de ligação entre o rs805304 e o rs805305, não poderíamos incluir simultaneamente ambos os polimorfismos em qualquer modelo multivariado, uma vez que não eram independentes. Portanto, quando aplicável, incluímos apenas o rs805304. Valores de P foram considerados significativos se $< 0,05$, exceto quando a análise global não foi significativa.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

A Tabela 3 resume as características clínicas e laboratoriais dos 228 indivíduos que participaram do estudo e que foram divididos em dois grupos: Pacientes, com 130 indivíduos com diagnóstico de disfunção erétil; e Controles, com 98 indivíduos saudáveis. As características clínicas dos dois grupos foram similares em partes. Houve diferença significativa entre os grupos para: idade; tabagismo; PAS; dosagens de colesterol (total, HDL e LDL), glicose e creatinina; número de hipertensos e diabéticos; pontuação do IIEF relacionada ao domínio função erétil (*score* FE); e concentrações plasmáticas de ADMA e nitrito (todos $P < 0,05$; Tabela 3). A maior média de idade para o grupo Pacientes já era esperada, tendo em vista que a prevalência de DE aumenta com a idade. Além disso, ao longo das coletas para o estudo, foi difícil encontrar indivíduos idosos e saudáveis ou jovens e com DE. Em relação à pressão arterial sistólica (PAS) e à dosagem de glicose, as diferenças nas médias entre os grupos são devidas ao grande número de pacientes hipertensos e diabéticos em relação aos controles. Curiosamente, os controles apresentaram maiores valores médios de colesterol total e LDL e menor valor médio de HDL em relação aos pacientes. A maioria dos pacientes faz tratamento com medicamentos para controle do colesterol, desta forma, essa diferença pode indicar casos de dislipidemia não conhecida nem tratada nos indivíduos controles. Quanto ao *score* FE, a grande diferença entre os grupos na pontuação média no domínio função erétil do IIEF já era esperada, visto que esse domínio é usado para classificar o grau de DE (vide Tabela 1, item 1.1), e mostra o quanto é prejudicada a função erétil dos pacientes em relação à dos controles. Conforme mostra a tabela, a concentração plasmática de ADMA foi quantificada para 87 indivíduos controles e 84 pacientes, já a de nitrito foi quantificada para 92 controles e 112 pacientes. As concentrações plasmáticas médias de ADMA e nitrito obtidas para o grupo Pacientes foram menor e maior, respectivamente, em relação às médias encontradas para o grupo Controle. Esse não era um fato esperado e este achado será discutido mais à frente.

Após realizar as quantificações de nitrito e ADMA no plasma dos voluntários incluídos no estudo, verificou-se se haveria correlação entre esses dois fatores em cada grupo (Figura 7). Para os pacientes, observou-se uma correlação negativa ($r = -0,37$; $P < 0,001$; Figura 7). Este resultado resistiu após correção por regressão linear multivariada ($\beta -0,57$; $P < 0,001$; $R^2 = 0,22$). Entretanto, não foi encontrada uma correlação entre as concentrações plasmáticas de nitrito e ADMA para os controles. ($r = 0,05$; $P = 0,679$; Figura 7). Este resultado foi mantido após correção por regressão linear multivariada ($\beta 0,02$; $P = 0,878$; $R^2 = 0,04$).

Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

Características	Controles (n = 98)	Pacientes (n = 130)
Idade (anos)	47 ± 9	55 ± 11*
Etnia (brancos/não brancos)	52/46	68/62
IMC (Kg/m ²)	27,7 ± 4,3	28,1 ± 4,8
Praticam atividade física (n)	59	72
Tabagismo (n)		
Fumantes	15	19
Ex-fumantes	23	62*
Não fumantes	60	49
Etilismo ^a (%)	11	10
PAS (mmHg)	130 ± 19	138 ± 19*
PAD (mmHg)	88 ± 13	89 ± 13
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	128 ± 55*
Ureia (mg/dL)	35 ± 9	33 ± 12
Creatinina (mg/dL)	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,3*
Hipertensos (n)	0	62*
Diabéticos (n)	5	52*
Score FE	29 ± 1	10 ± 7*
ADMA (µM)	0,90 ± 0,33 (n = 87)	0,81 ± 0,32 (n = 84)*
Nitrito (µM)	134 ± 73 (n = 92)	192 ± 172 (n = 112)*

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 Consumo de etanol >30 g/dia. Dados expressos como média ± desvio padrão, valores absolutos (n) ou frequências relativas (%). * P <0,05 *versus* Controles.

Em seguida, foi investigado se os scores FE de pacientes e controles correlacionavam-se com as concentrações plasmáticas de ADMA ou nitrito (Figura 8). No grupo Pacientes, foi encontrada uma correlação negativa dos scores FE com as concentrações plasmáticas de nitrito ($r = -0,23$; $P = 0,015$; Figura 8). Porém, este resultado não se manteve após correção por análise de regressão linear multivariada ($\beta -5,04$; $P = 0,152$; $R^2 = 0,16$). Todas as outras correlações não foram significativas (todas $P >0,05$; Figura 8), mesmo após a correção (todas $P >0,05$; dados não mostrados).

Figura 7 – Análise de correlação entre as concentrações plasmáticas de nitrito e ADMA nos grupos Pacientes e Controles

Resultados não normalizados. Correlação de Pearson, valores de r e P fornecidos no canto direito de cada gráfico. A linha contínua representa análise de regressão linear, já a linha tracejada representa o intervalo de confiança de 95%. * $P < 0,05$ significativo.

Figura 8 – Análise de correlação entre os scores FE e as concentrações plasmáticas de nitrito ou ADMA nos grupos Pacientes e Controles

Controles

Pacientes

Resultados não normalizados. Correlação de Spearman, valores de r e P fornecidos no canto direito de cada gráfico. A linha contínua representa análise de regressão linear, já a linha tracejada representa o intervalo de confiança de 95%. * $P < 0,05$ significativo.

Em seguida, foram obtidos os genótipos de Controles e Pacientes para os polimorfismos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* selecionados para o estudo. As Tabelas 4 e 5 mostram as distribuições dos genótipos e haplótipos, respectivamente, nos grupos Controles e Pacientes. As frequências observadas dos genótipos de cada polimorfismo nos dois grupos não apresentaram desvios em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (todas $P > 0,05$; Tabela 4).

Coincidentemente, as frequências observadas para os genótipos de cada polimorfismo do *DDAH2* (rs805304 e rs805305) foram muito próximas em ambos os grupos. A partir da comparação visual dos resultados das genotipagens, foi observada uma associação quase completa (mais de 99%) entre os alelos ancestrais (C e C) e entre os alelos variantes (A e G) dos dois SNPs em todas as amostras estudadas. Sendo assim, é possível inferir que estes polimorfismos estão em forte desequilíbrio de ligação ($r^2 \approx 1$) na amostra da população estudada, sem necessidade análise estatística específica.

Não foram encontradas associações significativas dos genótipos no modelo de herança aditivo nem dos haplótipos com os grupos de controles e pacientes. Estes resultados se mantiveram mesmo após as análises de regressão logística multivariada (todos $P > 0,05$; Tabelas 4 e 5). Também, foram analisadas associações dos genótipos com os dois grupos nos modelos de herança dominante e recessivo, porém não foram encontrados dados significativos, mesmo após a correção (dados não mostrados).

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 = 130)	P _{nc}	OR _{nc} (IC)	P _c	OR _c (IC)
<i>DDAH1</i>							
rs1554597	TT	40 (0,41)	60 (0,46)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	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)
		P_{HW} = 0,971 P_{HW} = 0,713					
		P_{nc} Geral = 0,578					
		P_c Geral = 0,332					
rs18582	GG	12 (0,12)	17 (0,13)	-	1,00 (referência)		1,00 (referência)
	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)
		P_{HW} = 0,971 P_{HW} = 0,979					
		P_{nc} Geral = 0,965					
		P_c Geral = 0,133					

(continua)

(conclusão)

SNP	Genótipo	Controles (n = 98)	Pacientes (n = 130)	P _{nc}	OR _{nc} (IC)	P _c	OR _c (IC)
DDAH2							
rs805304	CC	25 (0,26)	33 (0,25)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	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)
		P_{HW} = 0,997 P_{HW} = 0,855					
		P_{nc} Geral = 0,872					
		P_c Geral = 0,874					
rs805305 ^b	CC	25 (0,26)	34 (0,26)	-	1,00 (referência)		1,00 (referência)
	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)	-	-
		P_{HW} = 0,997 P_{HW} = 0,758					
		P_{nc} Geral = 0,843					

R²=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). ^b Devido ao forte desequilíbrio de ligação, os dois polimorfismos do *DDAH2* não são independentes entre si e não podem ser incluídos nos mesmos modelos multivariados; portanto, incluímos apenas o rs805304 e consideramos que ele marca os genótipos do rs805305, sendo: CC/CC, CA/CG e AA/GG. Modelo corrigido para idade, tabagismo e diabetes.

Tabela 5 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* entre os grupos Controles e Pacientes

SNP	Haplótipo	Controles (n = 196)	Pacientes (n = 260)	P _{nc}	OR _{nc} (IC)	P _c	OR _c (IC)
<i>DDAH1</i>							
	TG	9 (0,04)	15 (0,06)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	TA	117 (0,60)	157 (0,60)	0,621	0,81 (0,34 – 1,90)	0,802	1,13 (0,44 – 2,91)
	CG	61 (0,32)	81(0,21)	0,617	0,80 (0,33 – 1,94)	0,242	1,83 (0,67 – 5,10)
	CA	9 (0,04)	7 (0,13)	0,243	0,47 (0,13 – 1,69)	0,142	0,22 (0,03 – 1,57)
		P_{nc} Geral = 0,693					
		P_c Geral = 0,402					
<i>DDAH2</i>							
	CC	97 (0,49)	126 (0,48)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	CG	1 (0,01)	0 (0,00)	-	-	-	-
	AC	2 (0,01)	1 (0,01)	-	-	-	-
	AG	96 (0,49)	133 (0,51)	0,735	1,07 (0,74 – 1,55)	0,749	1,08 (0,68 – 1,61)

R²=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). Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%. Modelo corrigido para idade, tabagismo e diabetes. Uma vez que não entraram na análise mais de dois níveis da variável “haplótipos”, os valores de P apresentados nas colunas P_{nc} e P_c correspondem aos valores de P_{nc} Geral e P_c Geral.

Resolveu-se, então, examinar a influência dos genótipos e haplótipos dos SNPs estudados sobre as concentrações plasmáticas de ADMA. As Figuras 9 e 10 mostram as comparações das médias das concentrações plasmáticas de ADMA entre os portadores dos diferentes genótipos de cada polimorfismo (modelo aditivo) nos grupos Controles e Pacientes, respectivamente.

Figura 9 – ADMA vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Controles

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

Figura 10 – ADMA vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Pacientes

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

Na análise estatística não corrigida, não foram observadas associações significativas entre os genótipos no modelo aditivo dos polimorfismos estudados e as concentrações plasmáticas de ADMA em nenhum dos grupos (todas $P > 0,05$; Figuras 9 e 10). Também, foram analisadas associações dos genótipos nos modelos dominante e recessivo com as concentrações plasmáticas de ADMA nos dois grupos, porém não foram encontrados dados significativos (dados não mostrados). No entanto, após análise de regressão linear multivariada, foram encontradas associações significativas dos polimorfismos do *DDAH1* com as concentrações plasmáticas de ADMA no grupo Pacientes. No modelo aditivo, o rs1554597 teve os genótipos TT e TC associados positivamente (TT: β 0,13 e $P = 0,008$; TC: β 0,09 e $P = 0,016$; Tabela 6) e o genótipo CC associado negativamente (β -0,22 e $P < 0,001$; Tabela 6) com as concentrações plasmáticas de ADMA. Também no modelo aditivo, o rs18582 teve o genótipo GG associado positivamente (β 0,22 e $P < 0,001$; Tabela 6) e o genótipo AA associado negativamente (β -0,16 e $P = 0,001$; Tabela 6) com as concentrações plasmáticas de ADMA. Já no modelo recessivo, os genótipos TT ou TC do rs1554597 apresentaram uma tendência de associação positiva (β 0,05 e $P = 0,082$; Tabela 6) e o genótipo CC uma tendência de associação negativa (β -0,05 e $P = 0,082$; Tabela 6) com as concentrações plasmáticas de ADMA. Ainda no modelo recessivo, o rs18582 teve os genótipos GG ou GA associados positivamente (β 0,04 e $P = 0,032$; Tabela 6) e o genótipo AA associado negativamente (β -0,04 e $P = 0,032$; Tabela 6) com as concentrações plasmáticas de ADMA. No grupo Controles, não foram encontradas associações significativas.

Tabela 6 – 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 = 84)					
Modelo		Aditivo		Dominante		Recessivo		Aditivo		Dominante		Recessivo	
		R ² = 0,12		R ² = 0,10		R ² = 0,11		R ² = 0,21		R ² = 0,04		R ² = 0,09	
		RMSE = 0,16		RMSE = 0,16		RMSE = 0,16		RMSE = 0,16		RMSE = 0,17		RMSE = 0,16	
		β	P	β	P	β	P	β	P	β	P	β	P
Idade		-0,01	0,080	-0,01	0,119	-0,01	0,081	-0,01	0,538	-0,01	0,754	-0,01	0,518
Tabagismo													
<i>Fumante</i>		-0,07	0,032	-0,07	0,030*	-0,07	0,034*	-0,03	0,401	-0,02	0,568	-0,03	0,338
<i>Ex-fumante</i>		0,06	0,072	0,05	0,086	0,05	0,081	-0,01	0,657	-0,01	0,608	-0,01	0,969
<i>Não fumante</i>		0,02	0,378	0,02	0,326	0,02	0,386	0,04	0,153	0,03	0,243	0,03	0,237
Ser diabético		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			0,09	0,016*	0,01	0,664		
	CC	-0,01	0,943			-0,01	0,583	-0,22	< 0,001*			-0,05	0,082
		P Geral = 0,850						P Geral = 0,002*					

(continua)

(conclusão)

		Controles (n = 87)						Pacientes (n = 84)					
Modelo		Aditivo		Dominante		Recessivo		Aditivo		Dominante		Recessivo	
		R ² = 0,12		R ² = 0,10		R ² = 0,11		R ² = 0,21		R ² = 0,04		R ² = 0,09	
		RMSE = 0,16		RMSE = 0,16		RMSE = 0,16		RMSE = 0,16		RMSE = 0,17		RMSE = 0,16	
		β	P	β	P	β	P	β	P	β	P	β	P
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			-0,06	0,097	-0,03	0,326		
	AA	0,05	0,214					0,02	0,218				
	P Geral = 0,446						P Geral = 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	0,804	-0,01	0,897		
	AA	0,01	0,650					0,01	0,693				
	P Geral = 0,891						P Geral = 0,968						
rs805305 ^b		-		-		-	-	-		-	-	-	-

R², parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de ADMA foram logaritmicamente transformados. ^b Devido ao forte desequilíbrio de ligação, os dois polimorfismos do *DDAH2* não são independentes entre si e não podem ser incluídos nos mesmos modelos multivariados; portanto, incluímos apenas o rs805304 e consideramos que ele marca os genótipos do rs805305, sendo: CC/CC, CA/CG e AA/GG. * P < 0,05 significativo.

As Figuras 11 e 12 mostram as comparações das médias das concentrações plasmáticas de ADMA entre os portadores dos diferentes haplótipos de cada gene nos grupos Controles e Pacientes, respectivamente.

Figura 11 – ADMA vs haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* - grupo Controles

DDAH1

DDAH2

Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o *DDAH1*; e teste T de Student para o *DDAH2*. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%.

Figura 12 – ADMA vs haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* - grupo Pacientes

Valores de concentração plasmática de ADMA expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o *DDAH1*; e teste T de Student para o *DDAH2*. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%. * $P < 0,05$ significativo.

No grupo Controles, não foram observadas associações significativas entre os haplótipos de nenhum dos genes e as concentrações plasmáticas de ADMA (todas $P > 0,05$; Figura 11), mesmo após correção por análise de regressão linear multivariada (todas $P > 0,05$; Tabela 7). No grupo Pacientes, foram encontradas associações significativas dos haplótipos do gene *DDAH1* com as concentrações

plasmáticas de ADMA ($P = 0,039$; Figura 12), sendo observados maiores valores de ADMA plasmático para os portadores do haplótipo TG e menores valores para os portadores do haplótipo CA ($P < 0,05$; Figura 12). Após análise de regressão linear multivariada, estes resultados foram mantidos, verificando-se associação positiva do haplótipo TG ($\beta 0,12$ e $P = 0,016$; Tabela 7) e negativa do haplótipo CA ($\beta -0,18$ e $P = 0,002$; Tabela 7) com as concentrações plasmáticas de ADMA.

Tabela 7 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre os valores de concentração plasmática de ADMA nos grupos Controles e Pacientes

Modelo		Controles (n = 171)		Pacientes (n = 168)	
		R² = 0,11	RMSE = 0,15	R² = 0,09	RMSE = 0,16
		β	P	β	P
Idade		-0,01	0,012	-0,01	0,638
Tabagismo					
Fumante		-0,07	0,001	-0,02	0,236
Ex-fumante		0,05	0,009	-0,01	0,575
Não fumante		0,02	0,017	0,04	0,056
Ser diabético		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*
			P Geral = 0,240	P Geral = 0,008*	
DDAH2					
	CC	-0,01	0,442	0,01	0,401
	CG	-	-	-	-
	AC	-	-	-	-
	AG	0,01	0,442	-0,01	0,401

R², parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de ADMA foram logaritmicamente transformados. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%. * $P < 0,05$ significativo.

Também, foi verificada a influência dos genótipos e haplótipos dos SNPs estudados sobre as concentrações plasmáticas de nitrito. As Figuras 13 e 14 mostram as comparações das médias das concentrações plasmáticas de nitrito entre os portadores dos diferentes genótipos de cada polimorfismo (modelo aditivo) nos grupos Controles e Pacientes, respectivamente.

Figura 13 – Nitrito vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Controles

Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o modelo aditivo; e teste T de Student para o modelo dominante.

* $P < 0,05$ significativo.

Figura 14 – Nitrito vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Pacientes

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

No grupo Controles, portadores do genótipo GG do rs18582 obtiveram maiores concentrações plasmáticas de nitrito em relação aos portadores dos outros dois genótipos (GA e AA), tanto no modelo aditivo ($P = 0,002$; Figura 13) quanto no modelo dominante ($P < 0,001$; Figura 13). Também, foram analisadas associações dos genótipos com as concentrações plasmáticas de nitrito no modelo dominante para os outros 3 polimorfismos estudados e no modelo recessivo para os quatro polimorfismos estudados, mas não foram encontrados dados significativos (dados não mostrados). Após análise de regressão linear multivariada, estes resultados foram mantidos, o rs18582 teve o genótipo GG associado positivamente com as concentrações plasmáticas de nitrito, no modelo aditivo ($\beta 0,15$ e $P = 0,009$; Tabela 8) e no modelo dominante ($\beta 0,08$ e $P = 0,009$; Tabela 8), e os genótipos GA ou AA associados negativamente com as concentrações plasmáticas de nitrito, apenas no modelo dominante ($\beta -0,08$ e $P = 0,009$; Tabela 8).

No grupo Pacientes, não foram observadas associações significativas entre os genótipos no modelo aditivo dos polimorfismos estudados e as concentrações plasmáticas de nitrito (todas $P > 0,05$; Figura 14). Também, foram analisadas associações dos genótipos nos modelos dominante e recessivo com as concentrações plasmáticas de nitrito, entretanto não foram encontrados dados significativos (dados não mostrados). Estes resultados persistiram após análise de regressão linear multivariada (todos $P > 0,05$; Tabela 8).

Tabela 8 – 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 = 112)					
		Aditivo		Dominante		Recessivo		Aditivo		Dominante		Recessivo	
		R ² = 0,13		R ² = 0,12		R ² = 0,06		R ² = 0,09		R ² = 0,08		R ² = 0,08	
		RMSE = 0,18		RMSE = 0,18		RMSE = 0,19		RMSE = 0,25		RMSE = 0,25		RMSE = 0,25	
Modelo		β	P	β	P	β	P	β	P	β	P	β	P
Idade		-0,00	0,426	-0,00	0,384	-0,00	0,566	0,00	0,382	0,00	0,298	0,00	0,437
Tabagismo													
<i>Fumante</i>		-0,02	0,686	-0,02	0,530	-0,03	0,469	0,04	0,410	0,04	0,406	0,03	0,516
<i>Ex-fumante</i>		-0,01	0,765	-0,01	0,886	-0,00	1,000	0,04	0,326	0,03	0,370	0,04	0,270
<i>Não fumante</i>		0,03	0,355	0,03	0,301	0,03	0,321	-0,07	0,051	-0,07	0,061	-0,07	0,066
Ser diabético		-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	0,03	0,410	-0,05	0,338	-0,02	0,415	0,03	0,450
	CC	-0,06	0,272					0,06	0,449				
P Geral = 0,544								P Geral = 0,593					

(continua)

(conclusão)

		Controles (n = 92)						Pacientes (n = 112)					
Modelo		Aditivo		Dominante		Recessivo		Aditivo		Dominante		Recessivo	
		R ² = 0,13		R ² = 0,12		R ² = 0,06		R ² = 0,09		R ² = 0,08		R ² = 0,08	
		RMSE = 0,18		RMSE =0,18		RMSE = 0,19		RMSE = 0,25		RMSE = 0,25		RMSE = 0,25	
		β	P	β	P	β	P	β	P	β	P	β	P
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
	P Geral = 0,031*						P Geral = 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
	P Geral = 0,920						P Geral = 0,294						
rs805305 ^b		-		-		-	-	-		-		-	-

R², parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores de concentração plasmática de ADMA foram logaritmicamente transformados. ^b Devido ao forte desequilíbrio de ligação, os dois polimorfismos do *DDAH2* não são independentes entre si e não podem ser incluídos nos mesmos modelos multivariados; portanto, incluímos apenas o rs805304 e consideramos que ele marca os genótipos do rs805305, sendo: CC/CC, CA/CG e AA/GG. * P < 0,05 significativo.

As Figuras 15 e 16 mostram as comparações das médias das concentrações plasmáticas de nitrito entre os portadores dos diferentes haplótipos de cada gene nos grupos Controles e Pacientes, respectivamente.

Figura 15 – Nitrito vs haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* - grupo Controles

Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o *DDAH1*; e teste T de Student para o *DDAH2*. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%.

Figura 16 – Nitrito vs haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* - grupo Pacientes

Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para o *DDAH1*; e teste T de Student para o *DDAH2*. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%.

No grupo Controles, foi encontrada uma tendência de associação dos haplótipos do gene *DDAH1* com as concentrações plasmáticas de nitrito ($P = 0,051$; Figura 15), mas esse resultado não foi confirmado após análise de regressão linear multivariada ($P > 0,05$; Tabela 9). No grupo Pacientes, não foi encontrada nenhuma associação dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* com as concentrações

plasmáticas de nitrito (todas $P > 0,05$; Figura 16). No entanto, após correção por regressão linear multivariada, foram encontradas associações dos haplótipos do gene *DDAH2* com as concentrações plasmáticas de nitrito: o haplótipo CC foi associado negativamente (β -0,03 e $P = 0,045$; Tabela 9) e o haplótipo AG foi associado positivamente (β 0,03 e $P = 0,045$; Tabela 9).

Tabela 9 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre os valores de concentração plasmática de nitrito nos grupos Controles e Pacientes

Modelo		Controles (n = 182)		Pacientes (n = 224)	
		R ² = 0,06	RMSE = 0,18	R ² = 0,08	RMSE = 0,25
		β	P	β	P
Idade		-0,00	0,515	0,00	0,181
Tabagismo					
Fumante		-0,02	0,482	0,03	0,385
Ex-fumante		-0,01	0,751	0,04	0,116
Não fumante		0,03	0,171	-0,06	0,011*
Ser diabético		-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
		P Geral = 0,179		P Geral = 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 , parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%. * $P < 0,05$ significativo.

Por último, foi investigada a influência dos genótipos e haplótipos dos SNPs estudados sobre os scores FE dos pacientes. Esta investigação não foi feita para os controles pois, neste grupo, as diferenças nos scores de função erétil não refletem em mudança no quadro de saúde dos indivíduos (eles continuam sem DE). As Figuras 17 e 18 mostram as comparações das médias dos scores FE entre os portadores dos diferentes genótipos de cada polimorfismo (modelo aditivo) e dos diferentes haplótipos de cada gene, respectivamente.

Figura 17 – Score FE vs genótipos dos polimorfismos estudados - grupo Pacientes

Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 18 – Score FE vs haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* - grupo Pacientes

Valores do score de função erétil expressos como média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para o *DDAH1*; e Teste de Mann Whitney para o *DDAH2*. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência $<2\%$.

Não foram observadas associações significativas entre os genótipos no modelo aditivo dos polimorfismos estudados e os scores FE (todas $P > 0,05$; Figura 17). Estes resultados persistiram após análise de regressão linear multivariada (todos $P > 0,05$; Tabela 10). Também, foram analisadas associações dos genótipos nos modelos dominante e recessivo com scores FE, entretanto não foram

encontrados dados significativos, mesmo após correção (dados não mostrados). Para os haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2*, também não foram encontradas associações significativas com os scores FE (todas $P > 0,05$; Figura 18), mesmo após análise de regressão linear multivariada (todas $P > 0,05$; Tabela 11).

Tabela 10 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores de *score* FE no grupo Pacientes

Modelo	Pacientes (n = 130)	
	R² = 0,17	RMSE = 6,63
	β	P
Idade	-0,21	<0,001*
Tabagismo		
<i>Fumante</i>	-1,33	0,244
<i>Ex-fumante</i>	1,26	0,152
<i>Não fumante</i>	0,08	0,932
Ser diabético	-1,15	0,066
<i>DDAH1</i>		
rs1554597		
TT	-1,03	0,490
TC	1,12	0,330
CC	-0,08	0,962
rs18582	P Geral = 0,503	
GG	0,154	0,937
GA	-0,292	0,797
AA	0,138	0,930
	P Geral = 0,964	
<i>DDAH2</i>		
rs805304		
CC	-0,625	0,510
CA	-0,165	0,838
AA	0,790	0,381
	P Geral = 0,672	
rs805305 ^b	-	-

R^2 , parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. ^b Devido ao forte desequilíbrio de ligação, os dois polimorfismos do *DDAH2* não são independentes entre si e não podem ser incluídos nos mesmos modelos multivariados; portanto, incluímos apenas o rs805304 e consideramos que ele marca os genótipos do rs805305, sendo: CC/CC, CA/CG e AA/GG. * $P < 0,05$ significativo.

Tabela 11 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* sobre os valores de *score* FE no grupo Pacientes

Modelo	Pacientes (n = 259)	
	R ² = 0,15	RMSE = 6,51
	β	P
Idade	-0,21	<0,001*
Tabagismo		
<i>Fumante</i>	-1,31	0,093
<i>Ex-fumante</i>	1,18	0,052
<i>Não fumante</i>	0,13	0,826
Ser diabético	-1,25	0,003*
<i>DDAH1</i>		
TG	-0,44	0,757
TA	-0,77	0,371
CG	-0,17	0,859
CA	1,38	0,472
P Geral = 0,786		
<i>DDAH2</i>		
CC	-0,28	0,507
CG	-	-
AC	-	-
AG	0,28	0,507

R², parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Haplótipos CG e AC do gene *DDAH2* foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%. * P <0,05 significativo.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi encontrada uma maior média da concentração plasmática de nitrito para o grupo Pacientes em relação à média encontrada para o grupo Controles. Este achado não era esperado, pois, a DE é uma doença relacionada com a sinalização deficiente de óxido nítrico, tendo em vista que o NO é um dos principais mediadores envolvidos na ereção peniana.⁸⁸ Os principais metabólitos do NO são nitrito e nitrato, no entanto, o nitrito serve como um marcador para a atividade recente de NOs, uma vez que sua meia vida plasmática é muito curta (cerca de 5 minutos).⁸⁹ Portanto, os níveis de nitrito podem ajudar a prever a saúde das células endoteliais.⁸⁹ O grupo controle deste estudo tem níveis de nitrito que estão dentro dos níveis médios da literatura⁸⁹. É possível que as altas concentrações plasmáticas de nitrito dos pacientes (acima do grupo Controle) possam envolver uma ativação da iNOS devido a processos inflamatórios, fato que tem sido demonstrado na literatura.⁸⁹ Isso é consistente com artigos publicados anteriormente, mostrando que a responsividade do Sildenafil foi melhor em pacientes de DE com níveis reduzidos de nitrito.^{24; 90; 91}

Em relação à ADMA, foi encontrada uma menor média da concentração plasmática deste metabólito para o grupo Pacientes em relação à média encontrada para o grupo Controles. Este achado não era esperado também, uma vez que a ADMA é um inibidor endógeno dos três subtipos existentes de NO sintases e já foi relacionada à função erétil prejudicada, à DE arteriogênica e a diversas doenças relacionadas com a DE (hipertensão, DM e doenças cardiovasculares).^{24; 56; 92} Além disso, o aumento dos estados inflamatórios na verdade reduz a expressão de DDAH1 e, portanto, era esperado um aumento nos níveis de ADMA em vez da diminuição que foi encontrada.⁹³ No entanto, a ADMA reduzida implicará no aumento da produção de NO, por exemplo, pela enzima iNOS.

Os principais resultados deste estudo serão apresentados e discutidos abaixo em forma de perguntas que estão agrupadas de letras A até G:

- A. As concentrações plasmáticas de ADMA afetam as concentrações plasmáticas de nitrito?

Os resultados obtidos através das análises nos mostram uma correlação negativa no grupo Pacientes, sendo assim quanto menor a concentração plasmática de ADMA maior será a concentração circulante de nitrito (biomarcador da produção de NO). A redução causal da produção de NO pela ADMA já foi mostrada em estudos com modelos animais ⁹⁴, e também observada em humanos com pré-eclâmpsia. ⁹⁵ Por outro lado, outros estudos (envolvendo mulheres após a menopausa e pacientes com transplante de rim) não relataram essa correlação entre ADMA e NO. ^{96;97} No grupo Controle, não foi encontrada nenhuma correlação entre ADMA e nitrito.

B. As concentrações plasmáticas de nitrito afetam a disfunção erétil (score FE)?

Através das análises estatísticas deste estudo não foi encontrada nenhuma correlação entre os níveis plasmáticos de nitrito e a função erétil. Apesar deste resultado não ter se apresentado significativo neste estudo, a literatura nos mostra que o NO é o principal agente no processo de vasodilatação e essencial no processo do controle da pressão arterial e para a fisiologia erétil. ^{98; 99; 100} Outro estudo também nos sugere que polimorfismos genéticos comuns no gene da eNOS contribuem para o risco de disfunção erétil por causarem impacto sobre a atividade desta enzima e a disponibilidade de NO. ¹⁰¹ Além disso, um estudo demonstrou que as concentrações plasmáticas de nitrito podem alterar as respostas ao tratamento com sildenafil (avaliadas por diferenças nos scores FE do IIEF) em pacientes com DE vasculogênica. ²⁴ É possível que existam outros fatores não considerados em nossa análise de regressão multivariada que tenham influenciado os dados bioquímicos. Ainda, é possível que o nitrito plasmático (sistêmico) não reflita bem o que ocorre no ambiente do corpo cavernoso. As amostras do estudo foram coletadas na fossa antecubital (braço) e não no corpo cavernoso. Além disso, os pacientes não se encontravam em teste de função erétil durante a coleta. Portanto, é possível que os níveis plasmáticos de nitrito coletados dessa forma reflitam mais o estado de função endotelial como um todo do paciente, e não o que ocorre diretamente no corpo cavernoso durante a ereção.

C. As concentrações plasmáticas de ADMA afetam a função erétil (score FE)?

Os resultados obtidos neste estudo não demonstraram correlação entre estes fatores tanto no grupo Pacientes quanto para os Controles. Apesar do resultado negativo, a literatura nos mostra que a ADMA está associada a maior risco cardiovascular ¹⁰² e pior função erétil em casos de DE vasculogênica. ¹⁰³ Ainda, um estudo demonstrou que as concentrações plasmáticas de ADMA podem alterar as respostas ao tratamento com sildenafil (avaliadas por diferenças nos scores FE do IIEF) em pacientes com DE vasculogênica. ²⁴ Aqui, pode-se considerar as limitações apontadas anteriormente sobre a forma de coleta das amostras biológicas.

D. Os SNPs afetam as concentrações plasmáticas de ADMA?

Foram encontradas associações significativas dos polimorfismos do *DDAH1* com as concentrações plasmáticas de ADMA no grupo Pacientes. O rs1554597 teve os genótipos TT e TC associados positivamente e o genótipo CC associado negativamente com as concentrações plasmáticas de ADMA. O rs18582 teve os genótipos GG e GA associados positivamente e o genótipo AA associado negativamente com as concentrações plasmáticas de ADMA. Além disso, haplótipos formados por estes dois polimorfismos também foram capazes de alterar as concentrações plasmáticas de ADMA (associação positiva do haplótipo TG e negativa do haplótipo CA).

Sabe-se que alelo variante C do rs1554597 foi fortemente relacionado a maiores concentrações plasmáticas de ADMA em pacientes com diabetes tipo 2 ⁷² e em um estudo de associação pangenômica (*genome-wide association study*, GWAS). ⁷⁷ Apesar destes dados não estarem de acordo com a associação negativa do genótipo CC com as concentrações plasmáticas de ADMA encontradas no presente estudo, um outro estudo em pacientes com DE vasculogênica também associou o genótipo CC do rs1554597 a menores concentrações plasmáticas de ADMA. ²⁴ Já as associações negativas do genótipo AA e positiva dos genótipos GG e GA do rs18582 com as concentrações plasmáticas de ADMA que relatamos aqui, são condizentes com a literatura. Portadores do alelo G tendem a mostrar

progressivamente maiores concentrações plasmáticas de ADMA se eles tiverem 1 ou 2 alelos de acordo com um estudo do tipo *genome-wide association* (GWAS).⁷⁷

Os polimorfismos do *DDAH2* (rs805304 e rs805305) não apresentaram associações significativas com o ADMA plasmático, na literatura os dados de associação destes SNPs com as concentrações circulantes de ADMA são conflitantes.^{105;84;85;86} No entanto, a enzima DDAH1 é a principal isoforma que controla o metabolismo de ADMA sistêmico e não a DDAH2, o que pode justificar a falta de associação encontrada neste estudo.^{16; 104}

E. Os SNPs afetam os níveis plasmáticos de nitrito?

No grupo Controles, foi encontrada uma associação dos genótipos do rs18582 do gene *DDAH1* com os níveis de nitrito. Portadores do genótipo GG do rs18582 obtiveram maiores concentrações plasmáticas de nitrito em relação aos portadores dos outros dois genótipos (GA e AA). Conforme citado na pergunta anterior, o genótipo GG foi associado a maiores concentrações plasmáticas de ADMA⁷⁷, sendo assim, esperava-se que ele fosse associado a menores concentrações plasmáticas de nitrito. Porém, nos controles, não foi encontrada uma correlação entre as concentrações plasmáticas de nitrito e ADMA nem mesmo associações dos polimorfismos estudados com alterações das concentrações plasmáticas ADMA.

No grupo Pacientes, os haplótipos DDAH2 foram associados concentrações plasmáticas de nitrito, tendo sido o haplótipo CC associado negativamente e o haplótipo AG associado positivamente. Esse resultado é condizente com a literatura, pois, em estudos anteriores, o alelo ancestral C de ambos os polimorfismos do *DDAH2* (rs805304 e rs805305) foram associados a maiores concentrações plasmáticas de ADMA^{105;85}, o que poderia culminar em uma menor produção de NO.

Como já citado acima, a enzima DDAH1 é a principal isoforma que controla o metabolismo de ADMA sistêmico,^{16; 104} já a DDAH2 é encontrada, principalmente, em tecidos que expressam a enzima eNOS, como o endotélio vascular^{40; 42}. É possível que a ADMA dentro do compartimento endotelial possa ser mais importante na determinação da produção de NO do que a ADMA circulante. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar essa hipótese.

F. Os SNPs afetam a função erétil (score FE) ?

Não foi encontrada nenhuma associação dos polimorfismos estudados dos genes *DDAH1* e *DDAH2* com a função erétil dos participantes. No entanto, um outro estudo associou os polimorfismos do *DDAH2* com alterações nas respostas ao tratamento com sildenafil (avaliadas por diferenças nos scores FE do IIEF) em pacientes com DE decorrente de prostatectomia.²⁴ Ainda, a literatura mostra que a ADMA está associada a uma pior função erétil em casos de DE vasculogênica¹⁰³. Apesar disso, acredita-se que esse resultado é condizente com os resultados bioquímicos encontrados aqui. Uma vez que não houve correlação entre os níveis plasmáticos de ADMA e a FE, as variações sutis que os polimorfismos causaram nos níveis de ADMA provavelmente também não seriam suficientes para causar alterações da FE.

G. Os SNPs estão associados ao risco para a disfunção erétil?

Não foi encontrada associação entre os polimorfismos estudados com o risco para a disfunção erétil. Porém, estes polimorfismos já foram associados a outras doenças intimamente relacionadas à DE como hipertensão, diabetes e outras doenças cardiovasculares.^{94; 77; 78; 79; 103; 104; 109; 105; 134}. Na amostra do estudo, essa associação ausente condiz com os dados bioquímicos mais uma vez. Os SNPs podem alterar as concentrações plasmáticas de ADMA, porém se a variação desses níveis não se associou à função erétil nos pacientes do estudo, era de se esperar um resultado negativo em relação à associação entre SNPs e doença.

O presente estudo teve como um dos objetivos, verificar se marcadores genéticos podem estar associados ao risco para disfunção erétil. Os pacientes com DE deste estudo compreendem aqueles cuja doença possui um perfil vasculogênico, que, geralmente, está associado a fatores de risco como doenças vasculares, diabetes, hipertensão e outros, os quais têm a disfunção endotelial como denominador comum. Dentre as possíveis causas para DE, foram excluídas as psicológicas, endócrinas, neurológicas e anatômicas. No entanto, não se pode afirmar que a disfunção erétil de todos os pacientes incluídos no estudo é de origem vasculogênica exclusivamente, uma vez que não foram verificados exames

específicos para determinar a causa da doença e não excluímos pacientes diabéticos, os quais apresentam alterações vasculogênicas e neurogênicas que ocorrem concomitantemente. Isso pode ser visto como uma limitação deste estudo. No grupo Pacientes, a DE foi avaliada clinicamente por um urologista, os voluntários tiveram a função erétil avaliada por meio da pontuação no domínio FE do questionário IIEF, uma importante ferramenta para classificação do grau de DE e que tem sido adotado como a medida padrão-ouro para a avaliação da eficácia em ensaios clínicos de DE. Outra virtude foi com as análises corrigidas pelas variáveis de confusão, que auxiliaram a evitar associações inexistentes ou a observação de resultados significativos falsos. Conforme citado no trabalho, é sabido que o envelhecimento, a diabetes e o tabagismo podem aumentar o risco para a DE^{18; 106; 107; 108}. A fim de corrigir a influência exercida por essas variáveis, e as diferenças clínicas entre os grupos caso e controle, análises de regressão linear multivariada e regressão logística multivariada foram feitas. De forma geral, tais modelos permitem confirmar os principais achados deste estudo e permitem encontrar um valor de P significativo em algumas análises que estavam com valores de P marginais.

Uma possível limitação do estudo é que foram avaliados polimorfismos que carecem de evidências funcionais diretas em afetar a expressão gênica do *DDAH1* e *DDAH2*. Os polimorfismos estudados apresentam correlação clínica com concentrações plasmáticas alteradas de ADMA, porém podem não ser funcionais pela hipótese de estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos conhecidos ou desconhecidos. Vale ressaltar também que a população estudada possui uma estrutura miscigenada (origem de diversos grupos étnicos diferentes com diferentes *backgrounds* genéticos), e que pode explicar o fato de haver discrepância entre os resultados aqui obtidos e parte dos dados publicados na literatura. Fatores como a interação de tratamentos farmacológicos, como o uso de omeprazol, podem influenciar as concentrações plasmáticas de ADMA inibindo a enzima *DDAH1*¹⁰⁹, fator este que não foi considerado no presente estudo. Destaca-se ainda, que em se tratando de um estudo de associação genética, parte dos resultados negativos obtidos devem ser considerados com cuidado, pois algumas análises são suscetíveis ao erro tipo 1 em função do número relativamente pequeno de participantes.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, conclui-se que os polimorfismos genéticos dos genes *DDAH1* e *DDAH2* possuem influência sobre a bioquímica, afetando os níveis plasmáticos de ADMA ou nitrito. Também observamos que os níveis plasmáticos de ADMA afetam os níveis plasmáticos de Nitrito em pacientes com DE. Apesar disto, as variações nestes dois parâmetros não se relacionaram com a função erétil, nem com a predisposição para a DE. Além disso, no presente estudo não foi observada a associação dos polimorfismos genéticos estudados com o risco para DE, nem a associação com variações da função erétil avaliada pelo IIEF.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ¹ Consensus development conference statement. National Institutes of Health. Impotence. December 7-9, 1992. **Int J Impot Res**, v. 5, n. 4, p. 181-284, 1993.
- ² B., A. A.; A., M. B.; B., M. J. Changes in Sexual Function in Middle-Aged and Older Men: Longitudinal Data from the Massachusetts Male Aging Study. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 52, n. 9, p. 1502-1509, 2004.
- ³ 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, 1994.
- ⁴ HATZICHRISTOU, D. et al. Diagnosing Sexual Dysfunction in Men and Women: Sexual History Taking and the Role of Symptom Scales and Questionnaires. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 13, n. 8, p. 1166-1182, 2016.
- ⁵ LAUMANN, E. O.; PAIK, A.; ROSEN, R. C. Sexual dysfunction in the united states: Prevalence and predictors. **JAMA**, v. 281, n. 6, p. 537-544, 1999.
- ⁶ LINDAU, S. T. et al. A Study of Sexuality and Health among Older Adults in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 8, p. 762-774, 2007.
- ⁷ SELVIN, E.; BURNETT, A. L.; PLATZ, E. A. Prevalence and Risk Factors for Erectile Dysfunction in the US. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n. 2, p. 151-157, 2007.
- ⁸ LEWIS, R. W. et al. Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction. **J Sex Med**, v. 7, n. 4 Pt 2, p. 1598-607, 2010.
- ⁹ SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. **Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 153-65, 2013.
- ¹⁰ MCVARY, K. T. Erectile Dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 24, p. 2472-2481, 2007.
- ¹¹ 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. 161-168, 2003.

-
- ¹² ROSEN, R. C. et al. The multinational Men's Attitudes to Life Events and Sexuality (MALES) study: I. Prevalence of erectile dysfunction and related health concerns in the general population. **Current Medical Research and Opinion**, v. 20, n. 5, p. 607-617, 2004.
- ¹³ DA COSTA GONÇALVES A.C., R. A. B., REIS F.M. Pathophysiology of erectile dysfunction: molecular aspects and clinical implications. **Journal of the Brazilian Society of Hypertension**, v. 10, n. 1, p. 4-10, 2007.
- ¹⁴ JACKSON, G. Treatment of erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease : guide to drug selection. **Drugs**, v. 64, n. 14, p. 1533-45, 2004.
- ¹⁵ SOLOMON, H.; MAN, J. W.; JACKSON, G. Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator. **Heart**, v. 89, n. 3, p. 251-3, 2003.
- ¹⁶ LEE, Y. C. et al. The associations among eNOS G894T gene polymorphism, erectile dysfunction and related risk factors. **BJU Int**, v. 100, n. 5, p. 1116-20, 2007.
- ¹⁷ INMAN, B. A. et al. A population-based, longitudinal study of erectile dysfunction and future coronary artery disease. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 2, p. 108-13, 2009.
- ¹⁸ MCVARY, K. T. Clinical practice. Erectile dysfunction. **N Engl J Med**, v. 357, n. 24, p. 2472-81, 2007.
- ¹⁹ GONZALES, A. I. et al. Validation of the International Index of Erectile Function (IIFE) for use in Brazil. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 2, p. 176-82, 2013.
- ²⁰ 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, 1997.
- ²¹ ROSEN, R. C.; CAPPELLERI, J. C.; GENDRANO, N., 3RD. The International Index of Erectile Function (IIEF): a state-of-the-science review. **Int J Impot Res**, v. 14, n. 4, p. 226-44, 2002.
- ²² 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, 1999.

-
- 23 KRANE, R. J.; GOLDSTEIN, I.; DE TEJADA, I. S. Impotence. **New England Journal of Medicine**, v. 321, n. 24, p. 1648-1659, 1989.
- 24 AZEVEDO, A. M. M. et al. Relationship between asymmetric dimethylarginine, nitrite and genetic polymorphisms: Impact on erectile dysfunction therapy. **Nitric Oxide**, v. 71, p. 44-51, 2017.
- 25 VIRAG, R.; BOUILLY, P.; FRYDMAN, D. IS IMPOTENCE AN ARTERIAL DISORDER? **The Lancet**, v. 325, n. 8422, p. 181-184, 1985.
- 26 DE TEJADA, I. S. et al. Impaired Neurogenic and Endothelium-Mediated Relaxation of Penile Smooth Muscle from Diabetic Men with Impotence. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 16, p. 1025-1030, 1989.
- 27 MUSICKI, B.; BURNETT, A. L. eNOS function and dysfunction in the penis. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 2, p. 154-65, 2006.
- 28 BOURAS, G. et al. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? **Curr Top Med Chem**, v. 13, n. 2, p. 180-200, 2013.
- 29 MASUDA, H. Significance of nitric oxide and its modulation mechanisms by endogenous nitric oxide synthase inhibitors and arginase in the micturition disorders and erectile dysfunction. **Int J Urol**, v. 15, n. 2, p. 128-34, 2008.
- 30 POPE, A. J.; KARUPPIAH, K.; CARDOUNEL, A. J. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. **Pharmacol Res**, v. 60, n. 6, p. 461-5, 2009.
- 31 KIELSTEIN, J. T. et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. **European journal of clinical investigation**, v. 33, n. 5, p. 370-5, 2003.
- 32 TOUSOULIS, D. et al. Methionine-induced homocysteinemia impairs endothelial function in hypertensives: the role of asymmetrical dimethylarginine and antioxidant vitamins. **American journal of hypertension**, v. 24, n. 8, p. 936-42, 2011.
- 33 TUTAREL, O. et al. Asymmetrical dimethylarginine--more sensitive than NT-proBNP to diagnose heart failure in adults with congenital heart disease. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33795, 2012.

- 34 YANG, L. et al. Asymmetric dimethylarginine concentration and recurrence of atrial tachyarrhythmias after catheter ablation in patients with persistent atrial fibrillation. **J Interv Card Electrophysiol**, v. 32, n. 2, p. 147-54, 2011.
- 35 BOISVERT, F. M. et al. A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. **Mol Cell Proteomics**, v. 2, n. 12, p. 1319-30, 2003.
- 36 TEERLINK, T. ADMA metabolism and clearance. **Vasc Med**, v. 10 Suppl 1, p. S73-81, 2005.
- 37 ACHAN, V. et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 8, p. 1455-9, 2003.
- 38 TEERLINK, T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 851, n. 1-2, p. 21-9, 2007.
- 39 VALLANCE, P.; LEIPER, J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 6, p. 1023-30, 2004.
- 40 LEIPER, J. M. et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. **Biochem J**, v. 343 Pt 1, p. 209-14, 1999.
- 41 PALM, F. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 6, p. H3227-45, 2007.
- 42 TRAN, C. T. et al. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. **Genomics**, v. 68, n. 1, p. 101-5, 2000.
- 43 NIJVELDT, R. J. et al. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). **Clin Nutr**, v. 22, n. 1, p. 17-22, 2003.
- 44 NIJVELDT, R. J. et al. Handling of asymmetrical dimethylarginine and symmetrical dimethylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 12, p. 2542-50, 2003.

-
- 45 DOWSETT, L. et al. Endothelial Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1 Is an Important Regulator of Angiogenesis but Does Not Regulate Vascular Reactivity or Hemodynamic Homeostasis. **Circulation**, v. 131, n. 25, p. 2217-25, 2015.
- 46 IMAMURA, M. et al. Alterations of NOS, arginase, and DDAH protein expression in rabbit cavernous tissue after administration of cigarette smoke extract. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 5, p. R2081-9, 2007.
- 47 MASUDA, H. et al. Accumulated endogenous NOS inhibitors, decreased NOS activity, and impaired cavernosal relaxation with ischemia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 6, p. R1730-8, 2002.
- 48 PARK, K. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rat penile tissue: reduced enzyme activity is responsible for erectile dysfunction in a rat model of atherosclerosis. **Int J Impot Res**, v. 21, n. 4, p. 228-34, 2009.
- 49 HASEGAWA, K. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial growth factor expression through Sp1 transcription factor in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 7, p. 1488-94, 2006.
- 50 LEIPER, J. et al. Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. **Nat Med**, v. 13, n. 2, p. 198-203, 2007.
- 51 LUNEBURG, N.; HARBAUM, L.; HENNIGS, J. K. The endothelial ADMA/NO pathway in hypoxia-related chronic respiratory diseases. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 501612, 2014.
- 52 LIND, L. et al. Genetic variation in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 gene (DDAH1) is related to asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels, but not to endothelium-dependent vasodilation. **Vasc Med**, v. 18, n. 4, p. 192-9, 2013.
- 53 WADHAM, C.; MANGONI, A. A. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulation: a novel therapeutic target in cardiovascular disease. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 5, n. 3, p. 303-19, 2009.
- 54 AZUMA, H. et al. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. **Br J Pharmacol**, v. 115, n. 6, p. 1001-4, 1995.

-
- 55 VALLANCE, P. et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **Lancet**, v. 339, n. 8793, p. 572-5, 1992.
- 56 PARONI, R. et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and L-arginine in patients with arteriogenic and non-arteriogenic erectile dysfunction. **Int J Androl**, v. 35, n. 5, p. 660-7, 2012.
- 57 ALTINOVA, A. E. et al. Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 5, p. 1881-5, 2007.
- 58 SURDACKI, A. et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 33, n. 4, p. 652-8, 1999.
- 59 PULLAMSETTI, S. et al. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. **FASEB J**, v. 19, n. 9, p. 1175-7, 2005.
- 60 AZADZOI, K. M. et al. Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. **J Urol**, v. 147, n. 1, p. 220-5, 1992.
- 61 BURNETT, A. L. et al. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 401-3, 1992.
- 62 KIM, N. et al. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. **J Clin Invest**, v. 88, n. 1, p. 112-8, 1991.
- 63 SAKAI, Y. et al. Involvement of increased arginase activity in impaired cavernous relaxation with aging in the rabbit. **J Urol**, v. 172, n. 1, p. 369-73, 2004.
- 64 WIERZBICKI, A. S. et al. Asymmetric dimethyl arginine levels correlate with cardiovascular risk factors in patients with erectile dysfunction. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 421-5, 2006.
- 65 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, 2012.

- 66 LEIPER, J.; NANDI, M. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 4, p. 277-91, 2011.
- 67 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.
- 68 REID-LOMBARDO, K. M.; PETERSEN, G. M. Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals. **Surgery**, v. 147, n. 4, p. 469-74, 2010.
- 69 AZEVEDO, A. M. M. **Marcadores de resposta ao sildenafil no tratamento da disfunção erétil: genes relacionados à dimetilarginina assimétrica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, , 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17133/tde-22082017-155237/>>. Acesso em: 2018-06-12.
- 70 JONES, L. C. et al. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 310, n. 3, p. 836-43, 2003.
- 71 ABHARY, S. et al. Sequence variation in DDAH1 and DDAH2 genes is strongly and additively associated with serum ADMA concentrations in individuals with type 2 diabetes. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9462, 2010.
- 72 ANDERSSOHN, M. et al. Genetic and environmental determinants of dimethylarginines and association with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. 3, p. 846-54, 2014.
- 73 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, 2014.
- 74 BOGER, R. H. et al. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. **Circulation**, v. 119, n. 12, p. 1592-600, 2009.
- 75 KRZYZANOWSKA, K. et al. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1834-9, 2007.

- ⁷⁶ LU, T. M. et al. Plasma asymmetric dimethylarginine predicts death and major adverse cardiovascular events in individuals referred for coronary angiography. **Int J Cardiol**, v. 153, n. 2, p. 135-40, 2011.
- ⁷⁷ 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, 2014.
- ⁷⁸ RHEE, E. P. et al. A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort. **Cell Metab**, v. 18, n. 1, p. 130-43, 2013.
- ⁷⁹ MAAS, R. et al. Polymorphisms in the promoter region of the dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene are associated with prevalence of hypertension. **Pharmacol Res**, v. 60, n. 6, p. 488-93, 2009.
- ⁸⁰ GAD, M. Z. et al. Association of DDAH2 gene polymorphism with cardiovascular disease in Egyptian patients. **J Genet**, v. 90, n. 1, p. 161-3, 2011.
- ⁸¹ PEREZ-HERNANDEZ, N. et al. Protective role of DDAH2 (rs805304) gene polymorphism in patients with myocardial infarction. **Exp Mol Pathol**, v. 97, n. 3, p. 393-8, 2014.
- ⁸² MARRA, M. et al. Chronic renal impairment and DDAH2-1151 A/C polymorphism determine ADMA levels in type 2 diabetic subjects. **Nephrol Dial Transplant**, v. 28, n. 4, p. 964-71, 2013.
- ⁸³ BAI, Y. et al. Common genetic variation in DDAH2 is associated with intracerebral haemorrhage in a Chinese population: a multi-centre case-control study in China. **Clin Sci (Lond)**, v. 117, n. 7, p. 273-9, 2009.
- ⁸⁴ O'DWYER, M. J. et al. Septic shock is correlated with asymmetrical dimethyl arginine levels, which may be influenced by a polymorphism in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase II gene: a prospective observational study. **Crit Care**, v. 10, n. 5, p. R139, 2006.
- ⁸⁵ WEISS, S. L. et al. Pilot study of the association of the DDAH2 -449G polymorphism with asymmetric dimethylarginine and hemodynamic shock in pediatric sepsis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33355, 2012.

- 86 XUAN, C. et al. Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 (DDAH 2) Gene Polymorphism, Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) Concentrations, and Risk of Coronary Artery Disease: A Case-Control Study. **Sci Rep**, v. 6, p. 33934, 2016.
- 87 PINHEIRO, L. C. et al. 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**, v. 87, p. 252-262, 2015.
- 88 LACCHINI, R.; TANUS-SANTOS, J. E. Pharmacogenetics of erectile dysfunction: navigating into uncharted waters. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 11, p. 1519-38, 2014.
- 89 OLIVEIRA-PAULA, G. H.; LACCHINI, R.; TANUS-SANTOS, J. E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. **Gene**, v. 575, n. 2, Part 3, p. 584-599, 2016.
- 90 LACCHINI, R. et al. nNOS polymorphisms are associated with responsiveness to sildenafil in clinical and postoperative erectile dysfunction. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 6, p. 775-784, 2014.
- 91 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. 805-811, 2013.
- 92 BÖGER, R. H. et al. Asymmetric dimethylarginine as an independent risk marker for mortality in ambulatory patients with peripheral arterial disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 269, n. 3, p. 349-361, 2010.
- 93 BALASUBRAMANIAN, V. et al. Post-Transcriptional Regulation of Hepatic DDAH1 with TNF Blockade Leads to Improved eNOS Function and Reduced Portal Pressure In Cirrhotic Rats. **Scientific Reports**, v. 7, p. 17900, 2017.
- 94 WANG, D. et al. Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. **Circ Res**, v. 101, n. 6, p. 627-35, 2007.
- 95 SANDRIM, V. C. et al. Interethnic differences in ADMA concentrations and negative association with nitric oxide formation in preeclampsia. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 19, p. 1457-1460, 2010.

-
- 96 CVETKOVIC, T. P. et al. Gender differences in oxidative and nitrosative stress parameters in kidney transplant patients on tacrolimus-based immunosuppression. **International Urology and Nephrology**, v. 46, n. 6, p. 1217-1224, 2014.
- 97 HIKMET, K. et al. Serum asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in obese postmenopausal women. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 25, n. 3, p. 174-178, 2011.
- 98 SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 153-165, 2013.
- 99 HURT, K. J. et al. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 4061-4066, 2002.
- 100 HURT, K. J. et al. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 41, p. 16624-16629, 2012.
- 101 YAO, H.-X. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of erectile dysfunction: An updated meta-analysis of genetic association studies. **International Journal of Surgery**, v. 54, p. 141-148, 2018.
- 102 H., B. R. et al. Asymmetric dimethylarginine as an independent risk marker for mortality in ambulatory patients with peripheral arterial disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 269, n. 3, p. 349-361, 2011.
- 103 R., P. 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. 660-667, 2012.
- 104 HU, X. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 7, p. 1540-6, 2011.
- 105 SEO, H. A. et al. Association of the DDAH2 gene polymorphism with type 2 diabetes and hypertension. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 98, n. 1, p. 125-31, 2012.

- ¹⁰⁶ SMITH, W. B., 2ND et al. PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence. **Int J Clin Pract**, v. 67, n. 8, p. 768-80, 2013.
- ¹⁰⁷ HUTTER, A. M., JR. Role of the cardiologist: clinical aspects of managing erectile dysfunction. **Clin Cardiol**, v. 27, n. 4 Suppl 1, p. I3-7, 2004.
- ¹⁰⁸ CARBONE, D. J., JR.; SEFTEL, A. D. Erectile dysfunction. Diagnosis and treatment in older men. **Geriatrics**, v. 57, n. 9, p. 18-24, 2002.
- ¹⁰⁹ TOMMASI, S. et al. Human dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 inhibition by proton pump inhibitors and the cardiovascular risk marker asymmetric dimethylarginine: in vitro and in vivo significance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2871, 2017.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

Continuação do Parecer: 2.616.765

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem alterações

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Carta de apresentação da emenda;
- Projeto com as alterações destacadas.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada

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_BASICAS_1010828_E1.pdf	15/02/2018 11:35:12		Aceito
Outros	cartadeapresentacaodaemenda.pdf	15/02/2018 11:33:15	Riccardo Lacchini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetomestradoGuilhermoemenda.pdf	15/02/2018 11:31:31	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	Projetodisfuncaoeretileerp2015v3.pdf	04/01/2016 15:57:57	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	TCLerev2.pdf	04/01/2016 15:58:57	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	cartaderespostaaoCEP.pdf	04/01/2016 15:58:02	Riccardo Lacchini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetomestradoGuilhermov2.pdf	04/01/2016 15:55:27	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	autorizacaocoletashcfmrp.pdf	30/11/2015 09:30:06	Riccardo Lacchini	Aceito
Orçamento	ORcAMENTO2.pdf	30/11/2015 09:29:41	Riccardo Lacchini	Aceito

Endereço: BANDEIRANTES 3900

Bairro: VILA MONTE ALEGRE

CEP: 14.040-902

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-9197

E-mail: cep@eerp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.616.765

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	justificativadadispensadoTCLE.pdf	23/11/2015 11:26:09	Riccardo Laochini	Aceito
Outros	EncaminhamentoCEPguilhermo.pdf	23/11/2015 11:24:20	Riccardo Laochini	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoguilhermoassinada.pdf	23/11/2015 11:21:14	Riccardo Laochini	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 24 de Abril de 2018

Assinado por:
Angelita Maria Stabile
(Coordenador)

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 B – Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE)

Folha 1/2

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 seus genes (que transmitem características hereditárias) que podem estar associados a uma maior chance de desenvolver disfunção erétil e podem alterar o sucesso do tratamento. Além disso, pretendemos estudar como seus genes 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 banco (termo técnico: biorepositório) 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/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 DESTES ESTUDOS.

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. Sílvio 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. Sílvio Tucci Júnior (FMRP-USP) (0xx16)

ANEXO C – 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 frequência você foi capaz de ter uma ereção durante uma relação sexual?	☐ Sem atividade sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
2. Nas últimas quatro semanas, quando você teve ereções sexuais com estimulação, com que frequência foram suas ereções, duras o suficiente para penetração?	☐ Sem estimulação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
3. Nas últimas quatro semanas, quando você tentou ter relação sexual com que frequência foi capaz de penetrar (entrar) na sua parceira?	☐ Não tentei ter relação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
4. Nas últimas quatro semanas, durante uma relação sexual com que frequência você foi capaz de manter sua ereção após ter penetrado (entrado) na sua parceira?	☐ Não tentei ter relação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca
5. Nas últimas quatro semanas, durante uma relação sexual, o quanto foi difícil para você manter sua ereção até o fim da relação?	☐ Não tentei ter relação sexual ☐ Extremamente difícil ☐ Muito difícil ☐ Difícil ☐ Pouco difícil ☐ Não difícil
6. Nas últimas quatro semanas, quantas vezes você tentou ter relação sexual?	☐ Não tentou ☐ 1-2 tentativas ☐ 3-4 tentativas ☐ 5-6 tentativas ☐ 7-10 tentativas ☐ 11 ou mais tentativas
7. Nas últimas quatro semanas, quando você tentou ter relação sexual com que frequência ela foi satisfatória para você?	☐ Não tentei ter relação sexual ☐ Quase sempre ou sempre ☐ A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) ☐ Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) ☐ Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) ☐ Quase nunca ou nunca

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

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