UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Pós graduação em Genética

LETÍCIA PERTICARRARA FEREZIN

Associação dos polimorfismos dos genes *PIK3CA* e *PIK3CG* com o risco para disfunção erétil

Ribeirão Preto
2021

LETÍCIA PERTICARRARA FEREZIN

Associação dos polimorfismos dos genes *PIK3CA* e *PIK3CG* com o risco para disfunção erétil

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências Biológicas (Genética).

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Riccardo Lacchini

Ribeirão Preto
2021

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

Ferezin, Letícia Perticarrara

Associação dos polimorfismos dos genes *PIK3CA* e *PIK3CG* com o risco para disfunção erétil.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética

Orientador: Lacchini, Riccardo.

1. Disfunção erétil. 2. Polimorfismos genéticos. 3. PI3K. 4. PIK3CA. 5. PIK3CG.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FEREZIN, L. P. Associação dos polimorfismos dos genes *PIK3CA* e *PIK3CG* com o risco para disfunção erétil. 118 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha avó Antônia (*in memoriam*),
ela que sempre foi e é, uma das minhas maiores inspirações
para meu mergulho nesse mundo extraordinário do envelhecimento,
e hoje posso afirmar que ela está presente em cada esforço
dedicado para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha mãe Fernanda, meu pai Gilson e minha irmã Taís, pelo amor no dia a dia, o apoio nos momentos difíceis e por confiarem na minha capacidade de alcançar além do que eu poderia imaginar.

A Deus, por me conceder a sabedoria e a fé para trilhar o meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Riccardo Lacchini por todo o aprendizado, orientação e conselhos. Agradeço por ser um ser humano ímpar e por não medir esforços para impulsionar meu crescimento, acadêmico e pessoal.

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

Aos colegas de laboratório Fernanda, Sherliane, Vitória, Anderson, Ana Maria, Cezar e Aline, por todo aprendizado e experiências adquiridas ao longo deste período, e com toda certeza, nenhum trabalho, inclusive este, seria possível sem a nossa união.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), o qual o presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES – Código de Financiamento 001, à FAPESP, que financiou este estudo com o auxílio à pesquisa 2016/04449-0, e ao CNPq que apoiou esta pesquisa indiretamente.

RESUMO

FEREZIN, L. P. **Associação dos polimorfismos dos genes *PIK3CA* e *PIK3CG* com o risco para disfunção erétil**. 2021. 118 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A disfunção erétil (DE) é definida como uma incapacidade constante de alcançar e manter a ereção suficiente para uma relação sexual satisfatória. Vários fatores estão envolvidos no risco e progressão da DE, como aumento do estresse oxidativo e redução da produção de óxido nítrico (NO). O eixo PI3K-AKT pode afetar várias vias de sinalização. Destacamos a fosforilação da eNOS-nNOS, ativando essas duas enzimas e aumentando a produção de NO. Estudos mostraram o envolvimento da PI3K em doenças cardiovasculares. Como o papel do óxido nítrico nessas doenças é claro, nos faz pensar que a via da PI3K pode ter grande relevância celular e fisiológica no contexto da DE. Portanto, o objetivo do estudo foi verificar a associação dos polimorfismos genéticos nos genes *PIK3CA* (rs6443624, rs9838411, rs2699887) *PIK3CG* (rs342286, rs17398575 e rs1129293) com a disfunção erétil e com os níveis plasmáticos de nitrito. Foram incluídos 288 indivíduos (139 pacientes com DEC e 149 voluntários saudáveis) do ambulatório de urologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Todos os sujeitos tiveram sangue coletado para testes genéticos e foram entrevistados. A função erétil foi avaliada pelo Questionário do Índice Internacional de Função Erétil (IIEF). A genotipagem foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. A análise estatística foi realizada por meio de testes qui-quadrado ou teste de Kruskall-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn. Para o gene PIK3CA, o haplótipo AGG (P=0,004) apresentou aumento de risco para DE. No rs9838411, os pacientes com DEC portadores do genótipo GG apresentaram melhora no score FE do IIEF (P=0,022), resultado confirmado na análise de regressão linear. No rs6443624, também foi possível observar que os pacientes DEC com a presença do genótipo CC apresentaram uma melhora no *score* FE do IIEF (P=0,027). No gene *PIK3CG*, apenas o haplótipo AAC (P_{NC}=<0,001) os pacientes DEC apresentou um maior risco para DE. No rs17398575 (P=0,026), os pacientes DEC portadores dos genótipos GG/GA apresentaram valores menores de nitrito, resultados confirmados nas análises de regressão linear multivariada. Ainda para o gene *PIK3CG* no rs1129293 (P = 0,062), o grupo controle,

os indivíduos saudáveis portadores do genótipo CC/CT apresentaram valores maiores de nitrito. Foi possível concluir que polimorfismos genéticos no gene *PIK3CA* (rs6443624 e rs9838411) estão associados a função erétil, enquanto polimorfismos genéticos no gene *PIK3CG* (rs17398575 e rs1129293) estão associados aos níveis plasmáticos de nitrito.

Palavras-chave: disfunção erétil, polimorfismos genéticos, PI3K, PIK3CA, PIK3CG.

ABSTRACT

FEREZIN, L. P. **Association of *PIK3CA* and *PIK3CG* gene polymorphisms with risk for erectile dysfunction**. 2021. 118 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Erectile dysfunction (ED) is defined as a constant inability to achieve and maintain an erection sufficient for satisfactory sexual intercourse. Several factors are involved in the risk and progression of ED, such as increased oxidative stress and reduced production of nitric oxide (NO). The PI3K-AKT axis can affect multiple signaling pathways. We highlight the phosphorylation of eNOS-nNOS, activating these two enzymes and increasing NO production. Studies have shown the involvement of PI3K in cardiovascular disease. As the role of nitric oxide in these diseases is clear, it makes us think that the PI3K pathway may have great cellular and physiological relevance in the context of ED. Therefore, the aim of the study was to verify the association of genetic polymorphisms in the *PIK3CA* genes (rs6443624, rs9838411, rs2699887) *PIK3CG* (rs342286, rs17398575 and rs1129293) with erectile dysfunction and with plasma levels of nitrite. It included 288 subjects (139 patients and 149 healthy volunteers DEC) of the urology clinic at the Ribeirão Preto Medical School. All subjects had blood drawn for genetic testing and were interviewed. Erectile function was assessed using the International Index of Erectile Function Questionnaire (IIEF). Genotyping was performed by Polymerase Chain Reaction in Real Time. Statistical analysis was performed using the chi-square test or the Kruskall-Wallis test, followed by Dunn's post-hoc test. For the *PIK3CA* gene, the AGG haplotype showed an increased risk for ED(P=0.004). Regarding rs9838411, patients with CED with the GG genotype showed an improvement in the IIEF FE score (P=0.022), a result confirmed in the linear regression analysis. The rs6443624 CC genotype was also associated with an improvement in the IIEF FE score(P=0.027),. In the *PIK3CG* gene, only the AAC haplotype (PNC=<0.001) CED patients presented a higher risk for ED. Regarding rs17398575, DEC patients carrying the GG/GA genotypes had lower nitrite values(P=0.026), results confirmed in multivariate linear regression analyses. Also for the *PIK3CG* gene in rs1129293 (P = 0.062), the control group, healthy individuals carrying the CC/CT genotype had higher nitrite values. It was possible to conclude that genetic polymorphisms in the

PIK3CA gene (rs6443624 and rs9838411) are associated with erectile function, while genetic polymorphisms in the *PIK3CG* gene (rs17398575 and rs1129293) are associated with plasma nitrite levels.

Keywords: erectile dysfunction, genetic polymorphisms, PI3K, PIK3CA, PIK3CG.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vias de regulação da eNOS..... 5
Figura 2 – Score FE vs genótipos dos polimorfismos do gene PIK3CA para o grupo DEC (modelo aditivo)..... 28
Figura 3 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo dominante)..... 29
Figura 4 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo recessivo)..... 30
Figura 5 – *Score* FE vs haplótipos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC..... 30
Figura 6 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo aditivo)..... 36
Figura 7 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo dominante)..... 37
Figura 8 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo recessivo)..... 38
Figura 9 – *Score* FE vs haplótipos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC..... 38
Figura 10 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo aditivo)..... 44
Figura 11 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo dominante)..... 45
Figura 12 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo recessivo)..... 46
Figura 13 - Nitrito *vs* haplótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC..... 46
Figura 14 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo Controle (modelo aditivo)..... 47
Figura 15 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo Controle (modelo dominante)..... 48
Figura 16 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo Controle (modelo recessivo)..... 49
Figura 17 - Nitrito *vs* haplótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo Controle..... 49

Figura 18 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo aditivo)..... 56
Figura 19 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo dominante)..... 57
Figura 20 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo recessivo)..... 58
Figura 21 - Nitrito *vs* haplótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC..... 58
Figura 22 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo Controle (modelo aditivo)..... 59
Figura 23 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo Controle (modelo dominante)..... 60
Figura 24 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo Controle (modelo recessivo)..... 61
Figura 25 - Nitrito *vs* haplótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo Controle..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação do grau de DE segundo a pontuação no domínio função erétil do questionário IIEF..... 3
Tabela 2: Polimorfismos escolhidos para este estudo nos genes *PIK3CA* e *PIK3CG* e suas associações encontradas na literatura..... 9
Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados: pacientes (DEC) e indivíduos saudáveis (controles)..... 19
Tabela 4 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* estudados entre os grupos DEC e Controles..... 21
Tabela 5 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* estudados entre os grupos DEC e Controles..... 23
Tabela 6 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *PIK3CA* entre os grupos DEC e Controles..... 25
Tabela 7 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *PIK3CG* entre os grupos DEC e Controles..... 26
Tabela 8 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo aditivo)..... 32
Tabela 9 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo dominante)..... 33
Tabela 10 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo recessivo)..... 34
Tabela 11 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *PIK3CA* sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles..... 35
Tabela 12 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo aditivo)..... 40

Tabela 13 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo dominante)..... 41
Tabela 14 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo recessivo)..... 42
Tabela 15 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene PIK3CG sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles..... 43
Tabela 16 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo aditivo)..... 51
Tabela 17 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo dominante)..... 52
Tabela 18 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo recessivo)..... 53
Tabela 19 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *PIK3CA* sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles..... 54
Tabela 20 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo aditivo)..... 63
Tabela 21 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo dominante)..... 64
Tabela 22 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos 65

genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo recessivo).....
Tabela 23 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *PIK3CG* sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT - proteína quinase B

AMP_C - monofosfato cíclico de adenosina

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

DCC - doença cardíaca coronariana

DE - disfunção erétil

DEC - disfunção erétil clínica

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EERP - Escola de enfermagem de Ribeirão Preto

EGFRI - inibidor do receptor do fato de crescimento epidérmico

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

GMP_C - monofosfato cíclico de guanosina

HCFMRP - Hospital das clínicas da faculdade de medicina de Ribeirão Preto

HDL - lipoproteína de alta densidade

IC - interval de confiança de 95%

IIEF - índice internacional de função erétil

IMC - índice de massa corporal

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LDL - lipoproteína de baixa intensidade

MMAS - estudo de envelhecimento masculino de Massachusetts

NANC - sistema nervoso não-adrenérgico não-colinérgico

NHWS - pesquisa nacional de saúde e bem-estar

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

OR_C - valor de odds ratio referente a estatística corrigida

OR_{NC} - valor de odds ratio referente a estatística não corrigida

P101 - subunidade regulatória da classe IB da PI3K

P110 - subunidade catalítica da classe IA da PI3K

P85 - subunidade regulatória da classe IA da PI3K

PAD - pressão arterial diastólica

PAS - pressão arterial sistólica

P_C - valor de P referente a estatística corrigda

PCR - reação em cadeia da polimerase

PDK1 - quinase dependente de fosfatidilinositol

P_{HW} - valor de P referente ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

PI(3,4,5)P_3 - fosfatidilinositol (3,4,5) –trisfosfato

PI(4,5)P_2 - fosfatidilinositol (4,5) –bisfosfato

PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase

PIK3CA ou p110α - fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa

PIK3CB ou p110β - isoforma beta da subunidade catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase

PIK3CD ou p110δ - isoforma delta da subunidade catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase

PIK3CG ou p110γ - isoforma gama da subunidade catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase

PIK3R1 - subunidade alfa reguladora de fosfatidilinositol 3-quinase

PIK3R2 - subunidade reguladora beta de fosfatidilinositol 3-quinase

PIK3R3 - subunidade gama reguladora de fosfatidilinositol 3-quinase

PIK3R5 - subunidade reguladora 5 de fosfoinositida 3-quinase

PIP3 - fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

P_{NC} - valor de P referente a estatística não corrigida

R^2 - *Rsquare* - proporção da variância em um modelo de regressão

RMSE - *root mean square error*

***Score* FE** - pontuação do domínio função erétil

Ser1177 - anticorpo anti-fosfo Enos

SNP - polimorfismo de nucleotídeo único

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

USP - Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Disfunção erétil: conceito, prevalência, epidemiologia e tratamento..... 1
1.2 O óxido nítrico (NO) e a disfunção erétil..... 3
1.3 As fosfatidilinositol – 3 – quinases (PI3Ks) e o óxido nítrico..... 4
1.4 A PI3K e a disfunção erétil..... 6
1.5 Polimorfismos genéticos do gene *PIK3CA* e *PIK3CG* e a disfunção erétil.... 6
2. OBJETIVOS..... 11
2.1 Objetivo Geral..... 11
2.2 Objetivos específicos..... 11
3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 13
3. 1 Seleção dos participantes..... 13
3. 2 Avaliação da função erétil..... 14
3. 3 Análises laboratoriais..... 14
3. 4 Genotipagens..... 14
3. 5 Quantificação de nitrito..... 15
3. 6 Inferência de haplótipos e análises estatísticas..... 16
4. RESULTADOS..... 18
5. DISCUSSÃO..... 68
6. CONCLUSÃO..... 76
7. REFERÊNCIAS..... 77
ANEXO A..... 90
ANEXO B..... 94
ANEXO C..... 97

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Disfunção erétil: conceito, prevalência, epidemiologia e tratamento

Em decorrência do processo de envelhecimento e o aumento da expectativa de vida, tanto homens, quanto mulheres passam por alterações fisiológicas importantes que atingem sua saúde sexual conforme a idade avança[1]. Especificamente indivíduos idosos do gênero masculino, dentre as diversas alterações ocorridas pelo avanço da idade, sofrem com reduções nas ereções espontâneas que não acontecem de forma ágil como em sua juventude[2]. Além disso, os idosos de ambos os gêneros passam por mudanças físicas naturais tornando-os mais vulneráveis a ter conturbações e/ou doenças de origem orgânicas, como hipertensão, diabetes, obesidade, doenças cardíacas e pulmonares, doença de Parkinson, câncer de próstata, dentre outras, que ocasionam diminuição ou perda de interesse pelas questões sexuais [2].

A incapacidade de atingir e/ou manter uma ereção peniana suficiente para uma relação sexual satisfatória é definida como disfunção erétil (DE)[1]. À medida que a idade dos homens avançam, também é crescente a prevalência de DE, aos 40 anos 15% dos homens vivem com algum grau de DE, aos 60 anos essa porcentagem chega a 45 e aos 70 anos atinge 70%[3].

De acordo com o Estudo de Envelhecimento Masculino de Massachusetts (MMAS), o qual avaliou uma amostra de 1290 homens com idade entre 40 a 70 anos, entre 1987 e 1989, aleatoriamente em 11 cidades do estado de Massachusetts nos EUA, o envelhecimento aumenta o risco de DE 1,2% ao ano em homens com idades entre 40-49 anos e aumenta para 4,6% em homens com idade entre 60-69 anos[4]. Além disso, o MMAS traz que os processos fisiológicos que acometem cerca de 40% dos homens com faixa etária de 40 anos, podem de alguma forma, terem indícios de DE antes dos 40 anos de idade [5].

Mesmo a idade por si só seja um importante fator de risco para DE, existem outros fatores que colaboram de forma cumulativa ao envelhecimento, são eles: hipertensão, diabetes, hipogonadismo, efeitos colaterais de medicamentos, síndrome metabólica, aumento do índice de massa corporal (IMC), colesterol e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL)[6]. Além de medicamentos como,

betabloqueadores, diuréticos tiazídicos e medicamentos antidepressivos, podem caudar DE[7].

No Brasil, alguns dados epidemiológicos, da Pesquisa Nacional de Saúde e Bem-Estar (NHWS) de 2015 com 6.100 indivíduos com idade média de 43,8 anos, caracterizam que o Brasil tem uma prevalência de 42,1% de homens com DE, a prevalência mais baixa comparada com Itália, França, Alemanha, Espanha, Reino Unido, Estados Unidos e China[8]. Porém, no Brasil os homens que apresentam DE possuem idade mais jovem comparado com a idade dos homens com DE dos países citados anteriormente[8].

A DE é considerada multifatorial, pois pode ser causada por parâmetros orgânicos (clínicos) ou psicológicos, ou ainda, uma associação entre estes (mista). As causas que abrangem os parâmetros psicológicos são ansiedade, distúrbios psiquiátricos (depressão) e desordens interpessoais no relacionamento sexual. Já a etiologia orgânica envolve causas vasculares, endócrinas, neurológicas, manifestações urológicas e associação às drogas[9]. Vale destacar que 70% das causas de DE é por patologia orgânica, a origem mais comum é a vascular[10].

Para o diagnóstico da DE é necessário um exame físico que englobe avaliações dos sistemas cardiovascular, neurológico e genital, para que possa ser feito o delineamento das possíveis etiologias[11]. Para que isso ocorra, o primeiro passo para o diagnóstico de DE é o método clínico, em que consiste em o médico investigar a queixa principal do paciente com relação ao histórico sexual, conflitos no relacionamento, entre outros, e com isso rastrear estes com os fatores de risco para DE, para que assim se atente a associar estes fatores com uma possível etiologia da DE e posteriormente ser possível recomendar o melhor tratamento[12].

Além disso, outro meio de avaliação da DE é por questionários avaliativos multidimensionais, destacando o mais utilizado, o *International Index for Erectile Function* (IIEF) ou Índice Internacional de Função Erétil, que é composto por 15 questões que abrangem cinco domínios (função erétil, função orgástica, desejo sexual, satisfação no intercurso e satisfação geral). Em cada domínio é obtido uma pontuação final, que é a soma das questões, na qual quanto menores as pontuações, menor é a qualidade de vida sexual do indivíduo[13]. O IIEF é um questionário que já foi validado em 32 línguas, podendo ser usado por médicos e pesquisadores que possuem como objetivo avaliar a eficácia de intervenções em

ensaios clínicos e terapêuticos. Além disso, é altamente recomendado para uma avaliação diagnóstica para a gravidade da DE[13].

Em indivíduos com a vida sexual ativa, a DE pode ser classificada em cinco categorias, especificamente sobre o domínio função erétil do IIEF, na qual a pontuação pode variar de 6 a 30, como demostrado na tabela 1[14].

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

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

Fonte: Azevedo (2017)[15].

Existem vários tipos de tratamento para DE, dentre eles, injeções intracavernosas, medicação oral, entre outros. Um dos tratamentos mais utilizados para DE de etiologia orgânica é um potente inibidor da fosfodiesterase-5 (PDE5), o sildenafil[16]. Porém, apesar do sildenafil ser o fármaco mais utilizado para DE, sua resposta clínica ao tratamento está bem inferior às expectativas, está com uma média de sucesso de 70%. O insucesso terapêutico em 30% dos pacientes que usam sildenafil pode ser parcialmente explicado por alguns fatores genéticos que alteram a via do NO[17].

1.2 O óxido nítrico (NO) e a disfunção erétil

A função erétil é regulada por diversos sistemas do corpo, como neural, hormonal, mecânico, psicológico e vascular[18]. Para que aconteça de forma satisfatória a função sexual masculina, com a sustentação e alcance da ereção peniana, é necessário que haja um equilíbrio entre os sinais neurológicos, um meio hormonal e a saúde psicológica para que ocorra o fenômeno vascular[18].

Neste fenômeno vascular ocorre então a liberação de NO (formado sob a influência da enzima óxido nítrico sintase – NOS) pelo endotélio (eNOS) e pelos

neurônios (nNOS), com isso a enzima guanilato ciclase é estimulada formando o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). A partir disso, as células do músculo liso relaxam por meio da ativação de proteínas quinases[19]. Vale ressaltar, para que haja um funcionamento controlado da função erétil é necessário que o indivíduo possua um endotélio vascular saudável e inervação[20].

O NO tem um papel importante no aumento do fluxo sanguíneo arterial e no intumescimento do pênis, agindo como um neurotransmissor local, promovendo o relaxamento das trabéculas intracavernosas[21]. O NO é produzido a partir de L-arginina pela NOS, esta que possui três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS)[22]. O NO pode ser liberado por dois mecanismos importantes, pelas terminações nervosas não adrenérgicas/ não colinérgicas (NANC) e pelas células endoteliais. O NO é considerado o principal agente relaxante vasoativo responsável pelo relaxamento do corpo cavernoso do pênis e do músculo liso vascular, essencial para o controle da pressão arterial e para a fisiologia erétil[19].

Ao difundir do endotélio para a célula muscular lisa, o NO causa uma diminuição na concentração intracelular de cálcio, mediada pelo monofosfato cíclico de guanosina (GMP_C), levando ao relaxamento dessa célula. Outro mecanismo de ação do NO que também causa uma diminuição no nível de cálcio intracelular mediado pelo monofosfato de adenosina cíclico (AMP_C), é a fosforilação direta da eNOS (Ser1177) pela via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que ativa a proteína quinase B (AKT), resultando na redução da dependência de cálcio e liberação sustentada de NO endotelial[23]. A PI3K é responsável tanto pelo estresse de cisalhamento quanto pelo aumento do fator de crescimento do fluxo sanguíneo [24].

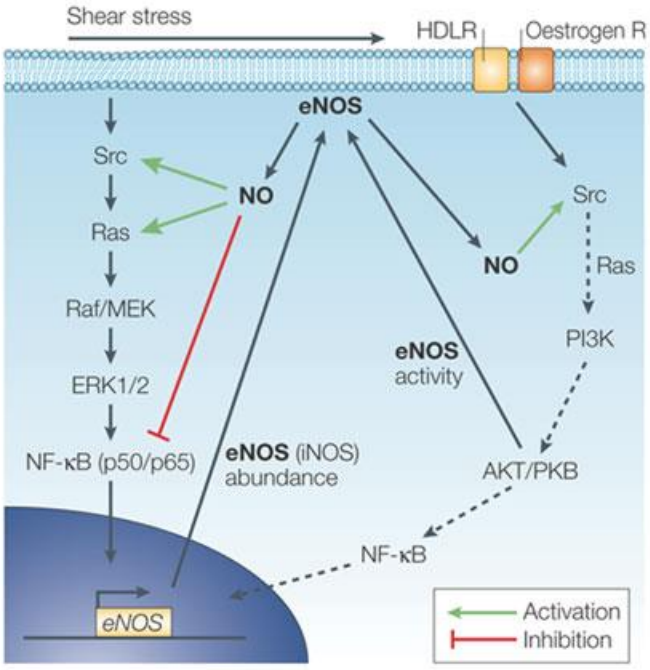
1.3 As fosfatidilinositol – 3 – quinases (PI3Ks) e o óxido nítrico

As fosfatidilinositol -3 – quinases (PI3K) são um conjunto de enzimas que são capazes de fosforilar proteínas e lipídios[25]. Um dos mais importantes mecanismos de sinalização intracelular, e que é extremamente importante na farmacologia, envolve a produção de segundos mensageiros como o fosfatidilinositol trifosfato (PI(3,4,5)P3) a partir de fosfolipídios de membrana. As PI3K participam deste processo gerando o PIP3 a partir de PI-4,5-P2[25].

O PIP3, por sua vez promove a interação entre a proteína serina-treonina quinase (AKT) e a quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK1), esta última que

por sua vez participa da ativação da AKT [26]. A AKT ativada por sua vez, fosforilará uma série de diferentes proteínas ativando dezenas de mecanismos intracelulares[26]. Entre as vias de sinalização que são afetadas pelo eixo PI3K-AKT está a fosforilação da eNOS no resíduo Ser1177[27; 28] (Figura 1) e fosforilação da nNOS no resíduo Ser1412[29; 30], levando à ativação das duas enzimas e maior produção de NO[29]. De fato, este é um dos mecanismos mais importantes para a regulação da função da eNOS e nNOS[27; 28] e acredita-se ser responsável pela manutenção da produção de NO necessária para sustentar a ereção peniana após a onda inicial de óxido nítrico advinda das fibras NANC[23; 29]. Outro fato que ilustra a importância da via PI3K / AKT / eNOS ou nNOS é o fato de que esta via pode ser estimulada farmacologicamente levando à ereção[31].

Figura 1- Vias de regulação da eNOS, reproduzido de Hess e cols. (2005)[32].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Esta figura evidencia que a via PI3K – AKT estimula a produção de óxido nítrico, através de uma fosforilação da eNOS que aumenta sua atividade.

Diversos estudos têm demonstrado que há envolvimento da PI3K em doenças cardiovasculares como diabetes[33], hipertrofia cardíaca[34], aterosclerose[35; 36], hipertensão[36] e outras como câncer[36]. Em algumas dessas doenças, há um claro papel do óxido nítrico, o que nos faz pensar que a via PI3K/AKT/eNOS ou nNOS possa ser de grande relevância celular e fisiológica no contexto de disfunção erétil.

1.4 A PI3K e a disfunção erétil

Existem poucas informações na literatura relacionando a disfunção erétil com o PI3K, apesar do claro envolvimento do PI3K com a regulação da produção do óxido nítrico. Por isso, vale ressaltar os poucos estudos que trazem essa temática: 1) foi demonstrado em um modelo de resistência a insulina (ratos Zucker), que o grau de relaxamento vascular induzido tanto por isoprenalina como por insulina (ambos envolvem a via PI3K) era reduzido por inibidores da PI3K apenas em animais controle, mostrando que os animais doentes teriam a via da PI3K inibida, o que possivelmente contribui para a disfunção erétil observada nesses animais[33]. 2) um novo fármaco experimental chamado FM19G11 promove a fosforilação da Ser1177 da eNOS por meio do estímulo da via PI3K / AKT / eNOS. Este fármaco reverteu a disfunção endotelial tanto em vasos de um modelo animal de disfunção erétil, como em corpo cavernoso humano de pacientes com disfunção erétil, corrigindo os efeitos de relaxamento vascular dependentes de endotélio causados por acetilcolina e insulina que a doença tinha prejudicado[37].

Essas evidências mostram um claro envolvimento da via PI3K / AKT / eNOS em contextos onde há disfunção endotelial, como por exemplo em disfunção erétil. E com isso, é lógico pensarmos que fatores genéticos que porventura afetem a função da PI3K podem contribuir para o desenvolvimento da doença e para o sucesso da terapia.

1.5 Polimorfismos genéticos do gene *PIK3CA* e *PIK3CG* e a disfunção erétil

A via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (PKB / Akt) é uma das principais vias regulatórias da célula e influencia quase todas as atividades celulares, incluindo replicação, crescimento, metabolismo, movimento e diferenciação[38]. A PI3K é dividida em três classes de enzimas (classes I, II e III), As PI3Ks da classe I são subdivididas em Classe IA e Classe IB, a Classe IA é composta por um heterodímero entre uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade reguladora (p85), dentre estas existem cinco proteínas homólogas da subunidade reguladora p85 (p85α, p55α, p50α, p85β e p55γ), as três primeiras variantes do mesmo gene *PIK3R1*, e as demais pelo gene *PIK3R2* e *PIK3R3*

respectivamente. Já as subunidades catalíticas são subdivididas em três variantes (p110α, p110β e p110δ), estas são expressas por três genes separados, *PIK3CA* (alvo de estudo deste projeto), *PIK3CB* e *PIK3CD* respectivamente. A Classe IB é composta por uma subunidade reguladora (p101) e por uma subunidade catalítica (p110γ), ambas são codificadas por um único gene para cada, *PIK3CG* (alvo de estudo deste projeto) para p110γ e *PIK3R5* para p101[39; 40]. A *PIK3CA* é expressa em todas as células, enquanto a *PIK3CG* é expressa em leucócitos e outros tipos de células, incluindo células endoteliais e fibroblastos[41].

Da mesma forma que existem poucos estudos básicos em modelos animais envolvendo o PI3K com disfunção erétil, uma busca por "*PIK3CA* polymorphism erectile dysfunction" e/ ou "*PIK3CG* polymorphism erectile dysfunction" no site do Pubmed encontra zero referências. Ao passo que isto dificulta um pouco a seleção de polimorfismos candidatos, representa uma oportunidade, um vasto território a ser explorado.

Em tese, o efeito que um determinado polimorfismo tem em um determinado gene pode ser percebido em maior ou menor escala em todas as situações nas quais esse gene participa. A observação do envolvimento da PI3K em diversos tipos diferentes de câncer[42] tem gerado um enorme investimento em descobrir como mutações e polimorfismos nesse gene podem afetar o grau de risco para essa doença[43; 44; 45]. Apesar da maioria das mutações e polimorfismos do *PIK3CA* associados ao câncer gerarem o efeito de ganho de função, especialmente nos exons 9 e 20[46; 47] (que no contexto de disfunção erétil geraria em tese maior produção de NO), muitos dos achados em câncer podem ser relevantes no contexto cardiovascular.

Com relação ao *PIK3CG,* um estudo recente demonstrou que este gene contribui para o controle dos níveis de AMP_C no sistema cardíaco, além disso, níveis baixos de *PIK3CG* em cardiomiócitos, no musculo liso vascular e no endotélio, destacam a importância deste gene no controle do tônus vascular[48] e na contratilidade cardíaca [49; 50; 51]. Ainda, camundongos, em modelos de hipertensão dependente de angiotensina-II, com perda de função de *PIK3CG* são protegidos contra danos, ou seja, a *PIK3CG* pode ser considerada um alvo importante para terapias cardioprotetoras[48].

Pensando na hipótese de ambas os genes (*PIK3CA* e *PIK3CG*) estarem de certa forma, indiretamente e diretamente associados ao contexto cardiovascular, e consequentemente maior produção de NO, seria de suma importância investigar variações genéticas destes associados ao contexto de disfunção erétil, pois no passado reiteradamente foi mostrado que alelos associados a maior produção de NO estavam associados a pior resposta ao sildenafil[52; 53]. Além disso, é de suma importância investigar polimorfismos que poderiam estar ligados a maior risco de desenvolvimento de disfunção erétil e outras doenças cardiovasculares por reduzida produção de NO. Alguns polimorfismos de interesse estão apresentados na Tabela 2, com as respectivas associações clínicas.

Vale ressaltar que este estudo é importante, pois a população brasileira é oriunda de diversas outras populações que migraram ao nosso país. É possível que através de efeito fundador, nossa população tenha maiores frequências de alelos variantes de polimorfismos nestas regiões críticas quando comparados a outras populações. Portanto podem existir marcadores que sejam relevantes para a nossa população que não foram estudados anteriormente.

Tabela 2: Polimorfismos escolhidos para este estudo nos genes *PIK3CA* e *PIK3CG* e suas associações encontradas na literatura.

Polimorfismo		Tipo de polimorfismo	Frequência do alelo variante*	Associação
rs6443624	A>C	Tag SNP	0.83	Recorrência do câncer de esôfago[54], risco para câncer endometrial[55], relacionado ao desenvolvimento do câncer de bexiga[56].
rs9838411	G>A	Tag SNP	0.18	Risco para câncer endometrial[55].
rs2699887	G>A	Tag SNP	0.26	Maior risco de metástase cerebral[57], sobrevida de pacientes com câncer endometrial[55].
rs342286	A>G	Tag SNP	0.45	Afeta a agregação plaquetária e causa impacto na gravidade do sangramento intraparenquimatoso[58].
rs17398575	G>A	Tag SNP	0.27	Associado a calcificação da aorta abdominal infra-renal[59], aumento do risco de isquemia em pacientes com doença coronariana[60].
rs1129293	C>T	Tag SNP	0.67	Efeito significativo ao risco para Transtorno de déficit de atenção/ hiperatividade[61], aumento do risco de isquemia em pacientes com doença coronariana[60], associado a alterações nos níveis de HDL[62].

*Frequências obtidas no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp usando as frequências reportadas pelo projeto HapMap (grupo étnico CEU).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar influência genética no genes *PIK3CA* e *PIK3CG* sobre a disfunção erétil.

2.2 Objetivos específicos

Verificar a associação dos polimorfismos no genes *PIK3CA* (rs6443624, rs9838411 e rs2699887) e *PIK3CG* (rs342286, rs17398575 e rs1129293) com alterações no risco para disfunção erétil e no score de função erétil (IIEF).

Verificar se associações determinadas no objetivo anterior também ocorrem com marcadores da produção do óxido nítrico.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1 Seleção dos participantes

Foram selecionados 288 indivíduos para este estudo, dentre eles, 139 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 149 voluntários saudáveis sem vínculo familiar direto com os pacientes. 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: 51408515.9.0000.5393 (ANEXO A)/ 34945120.1.0000.5391 (ANEXO B)].

Os critérios de inclusão dos pacientes 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. Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO C e ANEXO D) e, após a assinatura, foi aplicado o questionário traduzido do IIEF e coletado sangue por punção venosa em tubos a vácuo de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), gel e heparina de sódio, utilizando procedimentos adequados, para obtenção de sangue total, soro e plasma, respectivamente. As amostras foram armazenadas em freezers - 20 °C (sangue total) e - 80 °C (leucócitos, 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 E) 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 Genotipagens

A extração do DNA genômico foi realizada pelo método salting-out (com purificação com fenol-clorofórmio), o qual foi feito a partir de 500 µL de sangue total das amostras dos pacientes e controles. Foi acrescentado ao sangue 1,5 mL de solução A (Triton X 1%, $MgCl_2$ 5 mM, sacarose 0,32 M e Tris-HCl 10 mM pH 8), seguido por homogeneização e incubação em gelo por 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm a 4ºC. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram completados com solução A, homogeneizados e centrifugados novamente. Estes passos foram repetidos 4 vezes ou mais, até o sobrenadante ficar límpido e obterem-se pellets (leucócitos), que possuem uma cor branca, dentro dos tubos. Nos pellets foram adicionados 100 µL de solução B 2X (Na_2EDTA 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 1X) e 300 µL de fenol, com posterior homogeneização por inversão durante 5 minutos, centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm a 4ºC, e coleta da fase superior (aquosa) de cada amostra, que foi transferida para novo tubo. Aos novos tubos foram adicionados 150 µL de fenol e 150 µL de solução clorofórmio / álcool isoamílico (24:1), seguindo os mesmos passos da etapa anterior descrita acima. Seguiu-se com adição de 300 µL de solução clorofórmio / álcool isoamílico (24:1) e, novamente, os passos de homogeneização, centrifugação e transferência da fase aquosa das amostras para novos tubos. Após, observou-se o volume obtido de fase aquosa para cada amostra e adicionou-se 1/10 deste volume de acetato de sódio 3 M pH 5,4 e duas vezes o volume de etanol absoluto gelado (-20ºC) em cada tubo, que foram armazenados em freezer a - 20ºC por 2 horas.

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

Todos os polimorfismos deste estudo, tanto os do gene *PIK3CA* (rs6443624, rs9838411 e rs2699887), quanto os do gene *PIK3CG* (rs342286, rs17398575 e rs1129293) foram genotipados utilizando ensaios de discriminação alélica TaqMan - todas as reações foram realizadas utilizando técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real no aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems).

3. 5 Quantificação de nitrito

O nitrito foi quantificado em amostras de plasma heparina, conforme descrito em estudos prévios (AZEVEDO et al., 2017; PINHEIRO et al., 2015). Em resumo,

300 µL 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. 6 Inferência de haplótipos e análises estatísticas

A inferência dos haplótipos de cada gene foi realizada pelo programa PHASE 2.1. Os possíveis haplótipos para os três SNPs estudados do gene *PIK3CA* foram: CGG, AAG, CGA, AGG, CAG, AAA, AGA, CAA; e do gene *PIK3CG* foram: AAT, AAG, AAC, GGT, GAC, AGT, GGC e AGC. Os haplótipos com frequência <2% nos dois grupos foram excluídos das análises estatísticas.

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

Os efeitos dos genótipos, alelos e haplótipos sobre as medidas de resposta ao sildenafil e sobre a qualidade das respostas dos pacientes foram avaliados por análises de regressão linear multivariada e de regressão logística multivariada, respectivamente, utilizando o software JMP 5.1.2 (SAS Institute). As variáveis de importância clínica idade, IMC, hipertensão, diabetes, tabagismo e raça foram incluídas como fatores de confusão nos modelos de regressão linear e logística multivariadas. A fim de obter uma distribuição normal, os valores de *scores* IIEF e concentrações plasmáticas de nitrito foram transformados logaritmicamente e, então, incluídos como variáveis dependentes para regressão linear multivariada. Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos em todas as análises.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Na tabela 3 estão apresentadas as características clínicas e laboratoriais dos 288 indivíduos que participaram do estudo. Estes são compostos por dois grupos: paciente com DEC (n = 139) e indivíduos saudáveis (n = 149). As características clínicas dos dois grupos foram muito similares, embora haja diferença significativa nas variáveis: idade, pressão arterial diastólica (PAD), colesterol HDL, glicose, hipertensão, diabetes, *score* IIEF e na dosagem de nitrito entre os grupos ($P<0,05$; tabela 3).

A idade ser maior no grupo de pacientes com DEC já era esperado pelo fato da prevalência da DE aumentar com o avanço da idade. Em relação à diferença estatística presente na PAD e a dosagem de glicose, também já eram esperados devido ao grande número de pacientes com DEC hipertensos e diabéticos comparado com o grupo controle, esta informação é confirmada com a presença de uma diferença estatística significativa nas variáveis de hipertensão e diabetes.

Além disso, curiosamente o grupo controle apresentou maiores valores de colesterol total e baixos valores de HDL comparado com o grupo de pacientes. Isso pode ser explicado pelo fato dos pacientes já estarem em contato com algum tipo de tratamento com medicamentos para dislipidemia, enquanto que os indivíduos do grupo controle podem não saberem dessa informação de possuírem alguma dislipidemia desconhecida.

Com relação ao *score* IIEF, esse resultado já era esperado, pois o objetivo da pontuação média no domínio função erétil do IIEF é classificar o grau de DE, com isso, essa diferença estatística reafirma a presença de DE nos pacientes e ausência de DE no grupo controle. Ainda, curiosamente o grupo de pacientes apresentou maiores concentrações de nitrito comparado com o grupo controle, e mesmo com maiores concentrações possui uma diminuição da função erétil. Este não era um resultado esperado, porém, será discutido posteriormente.

Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados: pacientes (DEC) e indivíduos saudáveis (controles).

Características	DEC (n=139)	Controles (n=149)
Idade (anos)	56 ± 10	48 ± 9*
Etnia (brancos/não brancos)	74/65	84/64
IMC (Kg/m^2)	28,0 ± 4,7	28,7 ± 5,2
Praticam atividade física (%)	74	91
Tabagismo (n)		
Fumantes	7	11
Ex-fumantes	19	5
Não fumantes	113	133
Etilismo[a] (%)	7	11
PAS (mmHg)	138 ± 19	135 ± 21
PAD (mmHg)	88 ± 12	91 ± 13*
Colesterol total (mg/dL)	180,0 ± 38,8	195,7 ± 46,3
Colesterol HDL (mg/dL)	41,1 ± 9,1	34,9 ± 9,1*
Colesterol LDL (mg/dL)	110,2 ± 35,4	117,9 ± 35,3
Triglicerídeos (mg/dL)	157,2 ± 110,9	175,7 ± 97,8
Glicose (mg/dL)	126,4 ± 54,5	112,1 ± 88,4*
Ureia (mg/dL)	33,9 ± 12,2	37,2 ± 9,6
Creatinina (mg/dL)	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,3
Hipertensos (%)	46,7	29,5*
Diabéticos (%)	41,7	10,7*
Score IIEF	9,9 ± 6,9	27,9 ± 1,5*
Nitrito (µM)	195,1 ± 172,5 (n=111)	133,5 ± 71,6* (n=97)

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

Nas tabelas 4 e 5 estão apresentadas as distribuições dos genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* e *PIK3CG*, respectivamente, para os grupos DEC e

Controles. As frequências observadas dos genótipos de cada polimorfismo, para ambos os genes, nos dois grupos de estudo não apresentaram diferenças significativas em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, confirmam que a população do estudo está em equilíbrio (todas P >0,05; Tabela 4 e 5).

Ainda, nas tabelas 4 e 5 estão apresentados os resultados da análise *odds ratio* não corrigido e corrigido (regressão logística), que nos mostra a razão de chances de um dado evento, no caso, deste estudo a chance para o risco de DE. Não foi observada nenhuma diferença estatística significativa.

Tabela 4 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* estudados entre os grupos DEC e Controles.

SNP	Genótipo	DEC	Controles	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
PIK3CA		(n = 136)	(n = 117)				
rs6443624	CC	57 (0,42)	48 (0,41)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	AC	60 (0,44)	54 (0,46)	0,806	0,93 (0,55 – 1,59)	0,055	2,73 0,99 – 7,79)
	AA	19 (0,14)	15 (0,13)	0,871	1,07 (0,49 – 2,32)	0,074	0,29 (0,08 – 1,11)
		P_{HW} = 0,987	**P_{HW} =** 1,000				
		P_{nc} Geral = 0,936					
		P_c Geral = 0,132					
		(n = 136)	(n = 118)				
rs9838411	GG	61 (0,45)	57 (0,49)	-	1,00 (referência)		1,00 (referência)
	GA	62 (0,46)	56 (0,47)	0,896	1,03 (0,62 – 1,72)	0,683	1,29 (0,37 – 4,29)
	AA	13 (0,09)	5 (0,04)	0,103	2,43 (0,81 – 7,25)	0,087	1,00 (0,15 – 7,99)
		P_{HW} = 1,000	**P_{HW} =** 0,989				
		P_{nc} Geral = 0,255					
		P_c Geral = 0,761					

SNP	Genótipo	DEC	Controles	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
		(n = 136)	(n = 118)				
rs2699887	GG	96 (0,71)	79 (0,67)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	GA	38 (0,28)	34 (0,29)	0,766	0,92 (0,53 – 1,59)	0,448	1,81 (0,41 – 9,42)
	AA	2 (0,01)	5 (0,04)	0,171	0,33 (0,06 – 1,74)	0,468	0,38 (0,02 – 4,63)
		P_{HW} = 1,000	**P_{HW} =** 0,983				
		P_{nc} Geral = 0,388					
		P_c Geral = 0,745					

R^2=0,33. 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). Modelo corrigido para idade, IMC, diabetes, hipertensão, tabagismo e raça.

Tabela 5 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* estudados entre os grupos DEC e Controles.

SNP	Genótipo	DEC	Controles	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
PIK3CG		(n = 118)	(n = 110)				
rs342286	AA	58 (0,49)	40 (0,36)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	AG	47 (0,40)	58 (0,53)	0,039	0,56 (0,32 – 0,97)	0,647	0,79 (0,29 – 2,15)
	GG	13 (0,11)	12 (0,11)	0,516	0,74 (0,31 – 1,80)	0,990	1,01 (0,25 - 4,04)
		P_{HW} = 0,987	**P_{HW} =** 0,985				
		P_{nc} Geral = 0,121					
		P_c Geral = 0,838					
		(n = 116)	(n = 111)				
rs17398575	GG	79 (0,68)	66 (0,59)	-	1,00 (referência)		1,00 (referência)
	GA	33 (0,28)	37 (0,34)	0,312	0,74 (0,42 – 1,32)	0,971	1,02 (0,26 – 4,27)
	AA	4 (0,04)	8 (0,07)	0,158	0,42 (0,12 – 1,45)	0,293	0,31 (0,03 – 2,48)
		P_{HW} = 0,984	**P_{HW} =** 0,989				
		P_{nc} Geral = 0,270					
		P_c Geral = 0,165					

SNP	Genótipo	DEC	Controles	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
		(n = 127)	(n = 118)				
rs1129293	CC	84 (0,66)	64 (0,54)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	CT	37 (0,29)	49 (0,42)	0,043	0,57 (0,33 – 0,98)	0,314	0,52 (0,15 – 1,85)
	TT	6 (0,05)	5 (0,04)	0,886	0,91 (0,27 – 3,13)	0,552	1,84 (0,24 – 14,26)
		P_{HW} = 0,927	**P_{HW} =** 0,916				
		P_{nc} Geral = 0,126					
		P_c Geral = 0,544					

R^2=0,32. 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). Modelo corrigido para idade, IMC, diabetes, hipertensão, tabagismo e raça.

Nas tabelas 6 e 7 estão apresentadas as distribuições dos haplótipos dos polimorfismos de cada gene *PIK3CA* e *PIK3CG*, respectivamente, nos grupos DEC e Controles e os resultados da análise *odds ratio* não corrigido e corrigido (regressão logística). Na tabela 6 foi possível observar uma diferença significativa presente no haplótipo AGG (gene *PIK3CA*), a qual se confirmou na análise corrigida (P_{nc} = <0,001; P_c = 0,004). Indivíduos que possuem essa herança do haplótipo AGG podem apresentar menores chances de risco para DE, comparado com o haplótipo CGG. EO haplótipo AAC (gene *PIK3CG*) também apresentou um efeito de proteção quando comparado ao haplótipo ancestral.

Tabela 6 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *PIK3CA* entre os grupos DEC e Controles.

SNP	Haplótipo	DEC	Controles	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
PIK3CA		(n = 279)	(n = 234)				
	CGG	131 (0,48)	96 (0,41)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	AAG	87 (0,31)	72 (0,31)	0,559	0,88 (0,59 – 1,33)	0,461	1,37 (0,59 – 3,16)
	CGA	42 (0,15)	38 (0,16)	0,419	0,81 (0,48 – 1,35)	0,077	2,45 (0,91 – 6,74)
	AGG	11 (0,04)	28 (0,12)	<0,001*	0,29 (0,14 – 0,61)	0,004*	0,14 (0,03 – 0,51)
	CAG	1 (0,00)	-	-	-	-	-
	AAA	6 (0,02)	-	-	-	-	-
	AGA	1 (0,00)	-	-	-	-	-
	CAA	-	-	-	-	-	-
		P_{nc} Geral = 0,008*					
		P_c Geral = 0,028*					

R^2=0,33. 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 CAG e AGA do gene *PIK3CA* para o grupo DEC foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%. O AAA foi excluído da análise por se apresentar somente nos pacientes DEC. O CAA não apareceu para esta população do estudo. Modelo corrigido para idade, IMC, diabetes, hipertensão, tabagismo e raça. 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.

Tabela 7 – Regressão logística multivariada mostrando a distribuição dos haplótipos do gene *PIK3CG* entre os grupos DEC e Controles.

SNP	Haplótipo	DEC	Controles	P_{nc}	OR_{nc} (IC)	P_c	OR_c (IC)
PIK3CG		(n = 223)	(n = 218)				
	AGC	114 (0,51)	84 (0,39)	-	1,00 (referência)	-	1,00 (referência)
	GGC	32 (0,15)	40 (0,19)	0,072	0,59 (0,34 – 1,01)	0,889	0,92 (0,30 – 2,78)
	AGT	22 (0,10)	20 (0,09)	0,608	0,81 (0,41 – 1,58)	0,439	1,78 (0,41 – 7,61)
	GGT	19 (0,08)	22 (0,10)	0,227	0,64 (0,32 – 1,25)	0,087	3,37 (0,83 – 13,62)
	AAC	9 (0,04)	33 (0,15)	<0,001*	0,20 (0,09 – 0,44)	<0,001*	0,06 (0,01 – 0,29)
	GAC	22 (0,10)	3 (0,01)	-	-	-	-
	AAT	5 (0,02)	-	-	-	-	-
	GAT	-	16 (0,07)	-	-	-	-
	AAG	-	-	-	-	-	-
		P_{nc} Geral = <0,001*					
		P_c Geral = 0,076					

R^2=0,35. 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 AAT do gene *PIK3CG* para o grupo DEC, GAC para o grupo controle foram excluídos das análises estatísticas por possuírem frequência <2%, e os haplótipos GAC e GAT foram excluídos também da análise por não se apresentarem nos dois grupos, e o AAG não apareceu para esta população do estudo em ambos os grupos. Modelo corrigido para idade, diabetes e tabagismo. 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.

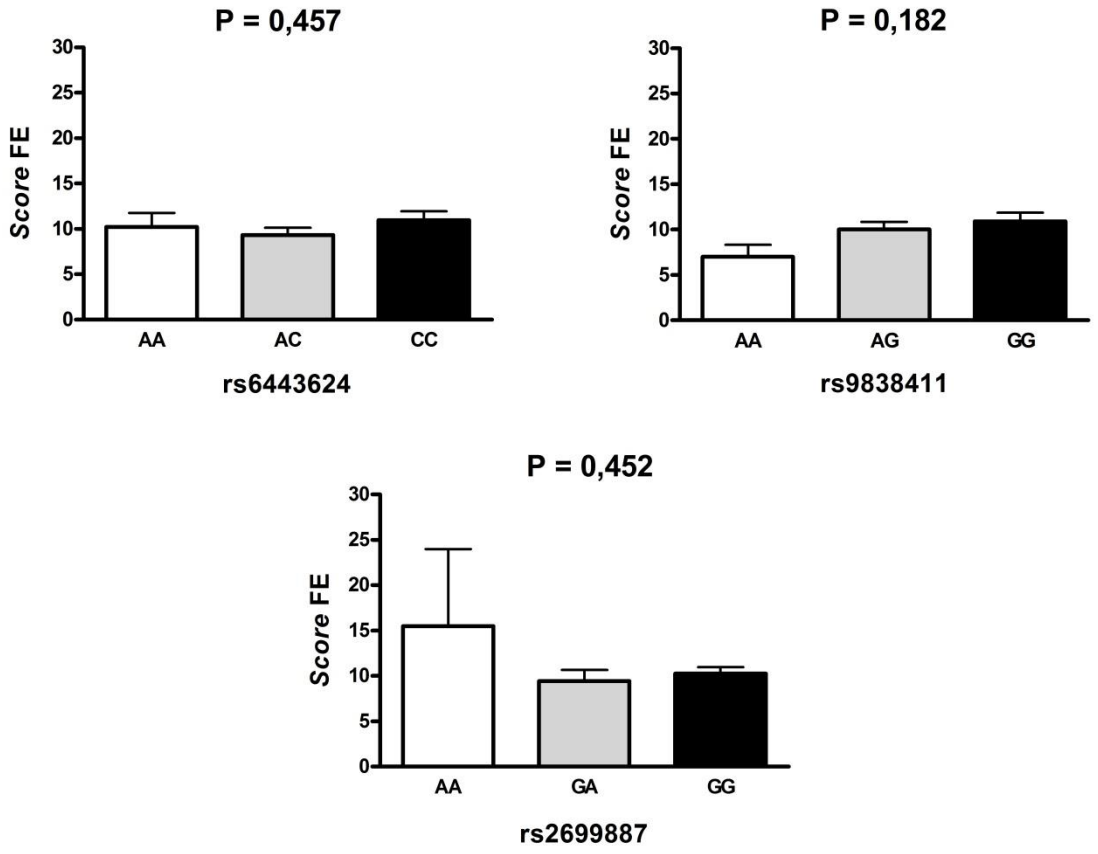
Para verificar a associação da DE com os genótipos dos polimorfismos de cada gene estudado, foi feita uma análise da associação dos genótipos com a pontuação do domínio FE (função erétil) do IIEF. Nas figuras 2, 3 e 4 então apresentados estes dados, para o gene *PIK3CA*, divididos em três modelos de análise dos genótipos: modelo aditivo, dominante e recessivo.

Na análise do modelo aditivo (Figura 2) não foi possível observar nenhuma diferença estatística significante, porém na análise do modelo dominante (Figura 3) e recessivo (Figura 4), o rs9838411 e o rs6443624 apresentaram diferenças estatísticas significantes, respectivamente. Para o rs9838411, os pacientes com a dominância do alelo G apresentaram uma melhora no *score* FE (média AA/AG = 9,5±6,5; média GG = 11,0±7,4 – classificação de DE severa para moderada, respectivamente), consequentemente, uma classificação de DE melhor, comparado com os genótipos AA/AG.

Para o rs6443624, na análise do modelo recessivo (Figura 4), os pacientes que apresentam o genótipo CC podem apresentar uma melhora no *score* FE (média AA/AC = 9,5±6,4; média CC = 11,0±7,5 – classificação de DE severa para moderada, respectivamente), logo uma melhora na classificação da DE, comparado com os genótipos AA/AC.

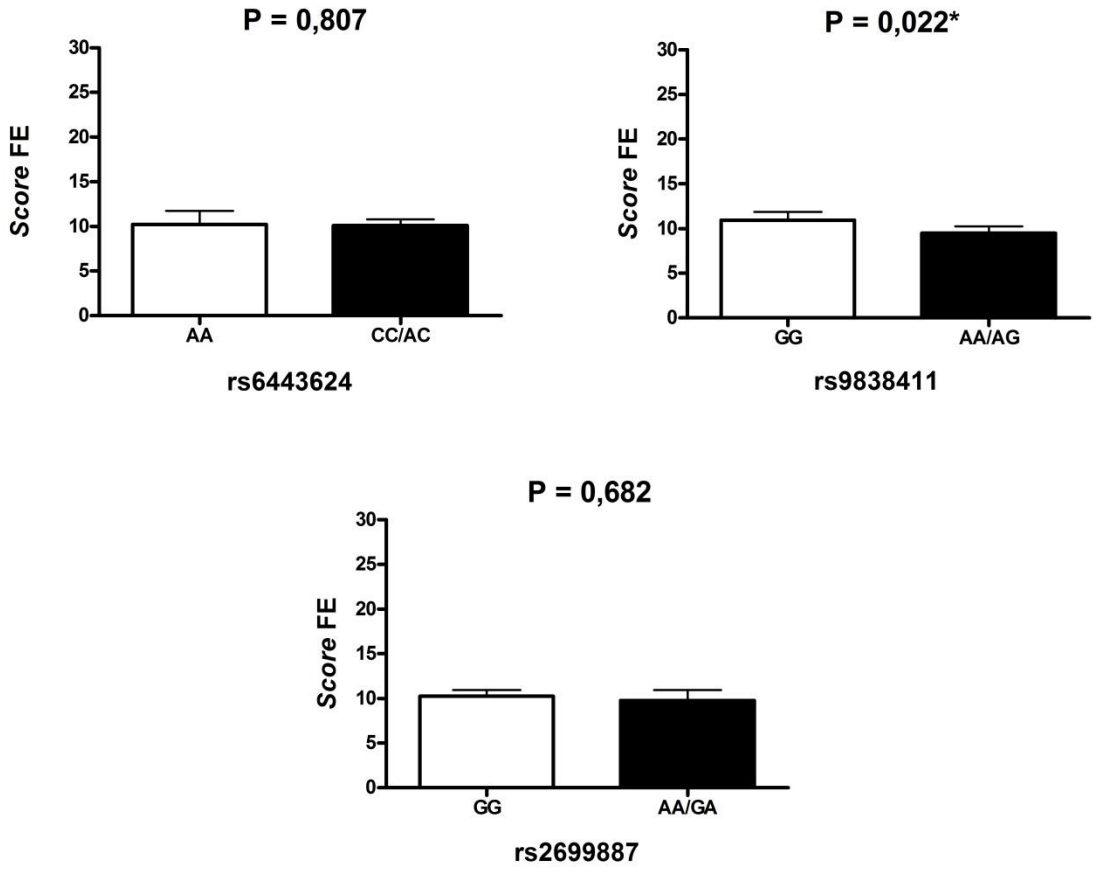
Na figura 5 estão apresentados os dados do *score* FE *versus* os haplótipos dos polimorfismos (rs6443624, rs9838411 e rs2699887) do gene *PIK3CA*, os quais não apresentaram diferença estatística significativa.

Figura 2 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo aditivo).



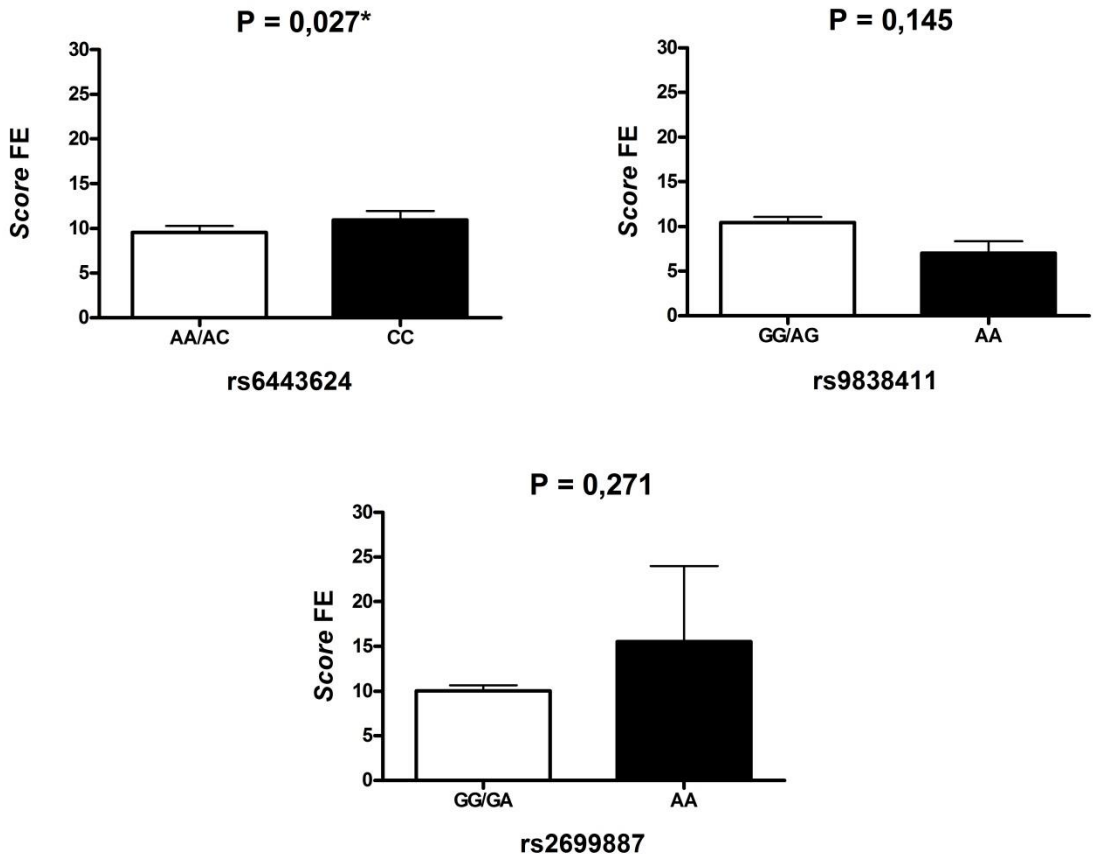
Valores do *score* de função erétil do IIEF expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 3 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo dominante).



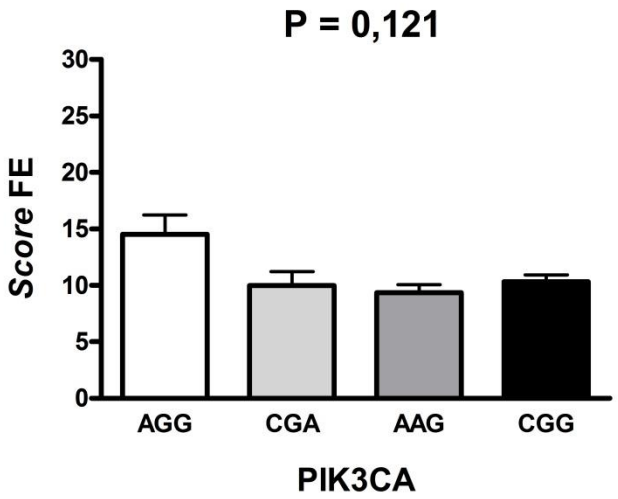
Valores do *score* de função erétil do IIEF expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student*. * P <0,05 significativo.

Figura 4 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo recessivo).



Valores do *score* de função erétil do IIEF expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student*. * P <0,05 significativo.

Figura 5 – *Score* FE vs haplótipos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC.



Valores do *score* de função erétil do IIEF expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Para uma maior confiabilidade dos resultados dos dados apresentados anteriormente, foi realizado uma regressão linear multivariada para todos os modelos (aditivo, dominante e recessivo) e para os haplótipos, mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados (rs6443624, rs9838411 e rs2699887) do gene *PIK3CA* e seus haplótipos sobre os valores do *score* FE do IIEF nos grupos de pacientes com DEC e controles (tabelas 8, 9, 10 e 11).

Somente na tabela 8 foi possível observar uma diferença significativa, especificamente para o rs9838411, os pacientes que apresentaram o genótipo AA manifestaram uma piora na DE, e ser hipertenso contribuiu ainda mais para esta afirmação. As demais análises (tabela 9, 10 e 11) não apresentaram diferença estatística significativa.

Tabela 8 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo aditivo).

Modelo		DEC (n = 136)		Controles (n = 113)	
		Aditivo		**Aditivo**	
		R^2 = 0,21		**R^2 = 0,13**	
		RMSE = 0,29		**RMSE = 0,02**	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<-0,01	0,008	<-0,01	0,022
IMC		<-0,01	0,913	<-0,01	0,058
Ser hipertenso		-0,07	0,017*	<-0,01	0,703
Ser diabético		-0,02	0,507	<0,01	0,983
Tabagismo					
Fumante		<-0,01	0,982	<0,01	0,951
Ex-fumante		0,03	0,599	<-0,01	0,573
Não fumante		-0,03	0,554	<0,01	0,367
Raça					
Brancos		<0,01	0,907	<-0,01	0,335
Não brancos		<-0,01	0,907	<0,01	0,335
PIK3CA		**B**	**P**	**B**	**P**
rs6443624	CC	-0,11	0,252	<-0,01	0,265
	AC	-0,09	0,129	<0,01	0,973
	AA	0,21	0,035	<0,01	0,234
		P Global = 0,071		**P Global =** 0,474	
rs9838411	GG	0,19	0,060	<0,01	0,376
	AG	0,09	0,192	<-0,01	0,340
	AA	-0,28	0,011*	<-0,01	0,866
		P Global = 0,039*		**P Global =** 0,423	
rs2699887	GG	-0,01	0,842	<0,01	0,998
	GA	-0,12	0,113	<0,01	0,991
	AA	0,14	0,326	<-0,01	0,993
		P Global = 0,131		**P Global =** 0,999	

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados. * P <0,05 significativo.

Tabela 9 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo dominante).

Modelo		DEC (n = 136)		Controles (n = 113)	
		Dominante		Dominante	
		R^2 = 0,16		R^2 = 0,13	
		RMSE = 0,30		RMSE = 0,02	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<-0,01	0,009	<-0,01	0,010
IMC		<-0,01	0,700	<-0,01	0,061
Ser hipertenso		-0,06	0,031	<-0,01	0,629
Ser diabético		-0,03	0,318	<0,01	0,944
Tabagismo					
Fumante		0,02	0,762	<-0,01	0,931
Ex-fumante		0,02	0,726	<-0,01	0,605
Não fumante		-0,05	0,364	<0,01	0,326
Raça					
Brancos		<0,01	0,938	<-0,01	0,290
Não brancos		<-0,01	0,938	<0,01	0,290
PIK3CA		**B**	**P**	**B**	**P**
rs6443624	AA	0,03	0,475	<0,01	0,226
	CC+AC	-0,03	0,475	<-0,01	0,226
rs9838411	GG	-0,05	0,097	<-0,01	0,251
	AA+AG	0,05	0,097	<0,01	0,251
rs2699887	GG	0,05	0,107	<-0,01	0,807
	AA+GA	-0,05	0,107	0,01	0,807

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 10 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo recessivo).

Modelo		DEC (n = 136)		Controles (n = 113)	
		Recessivo		Recessivo	
		R^2 = 0,15		R^2 = 0,12	
		RMSE = 0,31		RMSE = 0,02	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<-0,01	0,023	<-0,01	0,020
IMC		<0,01	0,922	<-0,01	0,082
Ser hipertenso		-0,06	0,033	<-0,01	0,671
Ser diabético		-0,02	0,474	<0,01	0,787
Tabagismo					
Fumante		0,03	0,725	<0,01	0,927
Ex-fumante		0,02	0,697	<-0,01	0,511
Não fumante		-0,05	0,294	<0,01	0,305
Raça					
Brancos		<-0,01	0,998	<-0,01	0,397
Não brancos		<0,01	0,998	<0,01	0,397
PIK3CA		**B**	**P**	**B**	**P**
rs6443624	CC	0,01	0,710	<0,01	0,777
	AA+AC	<-0,01	0,710	<-0,01	0,777
rs9838411	AA	-0,04	0,402	<0,01	0,435
	GG+AG	0,04	0,402	<-0,01	0,435
rs2699887	AA	0,10	0,343	<0,01	0,991
	GG+GA	-0,10	0,343	<-0,01	0,991

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 11 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *PIK3CA* sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles.

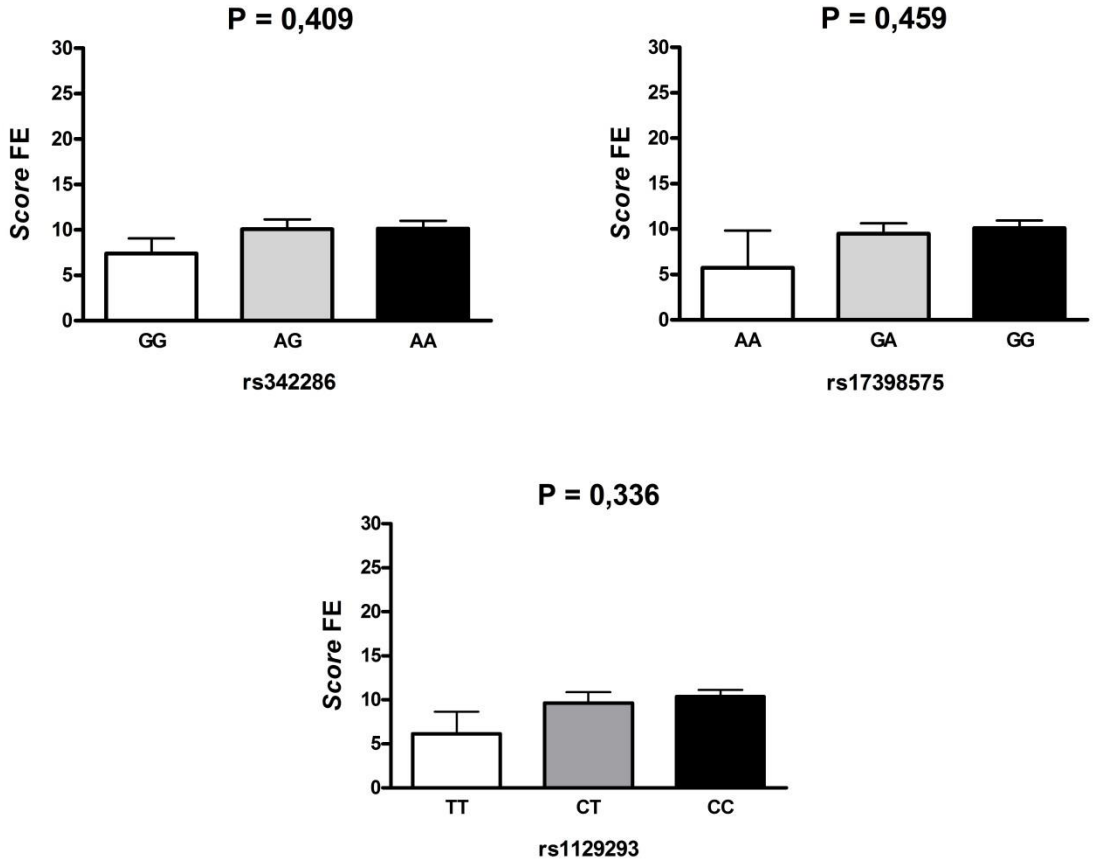
Modelo		**DEC (n = 270)**		**Controles (n = 113)**	
		R^2 = 0,15		**R^2 = 0,02**	
		RMSE = 0,30		**RMSE = 0,14**	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<-0,01	0,002	<0,01	0,253
IMC		<0,01	0,869	<-0,01	0,977
Ser hipertenso		<-0,01	0,001	<0,01	0,907
Ser diabético		-0,02	0,197	<0,01	0,644
Tabagismo					
Fumante		0,03	0,608	0,01	0,692
Ex-fumante		0,02	0,708	<-0,01	0,932
Não fumante		-0,04	0,203	<-0,01	0,716
Raça					
Brancos		<-0,01	0,935	0,01	0,192
Não brancos		<0,01	0,935	-0,01	0,192
PIK3CA		**B**	**P**	**B**	**P**
	CGG	-0,02	0,566	<-0,01	0,604
	AAG	-0,05	0,127	<-0,01	0,554
	CGA	-0,08	0,077	<0,01	0,739
	AGG	0,15	0,032	0,01	0,631
		P Global = 0,129		**P Global =** 0,883	

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Nas figuras 6, 7 e 8 então apresentados os dados do *score* FE do IIEF *versus* os polimorfismos estudados (rs342286, rs17398575 e rs1129293) para o gene *PIK3CG*, divididos em três modelos de análise dos genótipos: modelo aditivo, dominante e recessivo. Em todos os modelos analisados não foi possível observar nenhuma diferença estatística significativa.

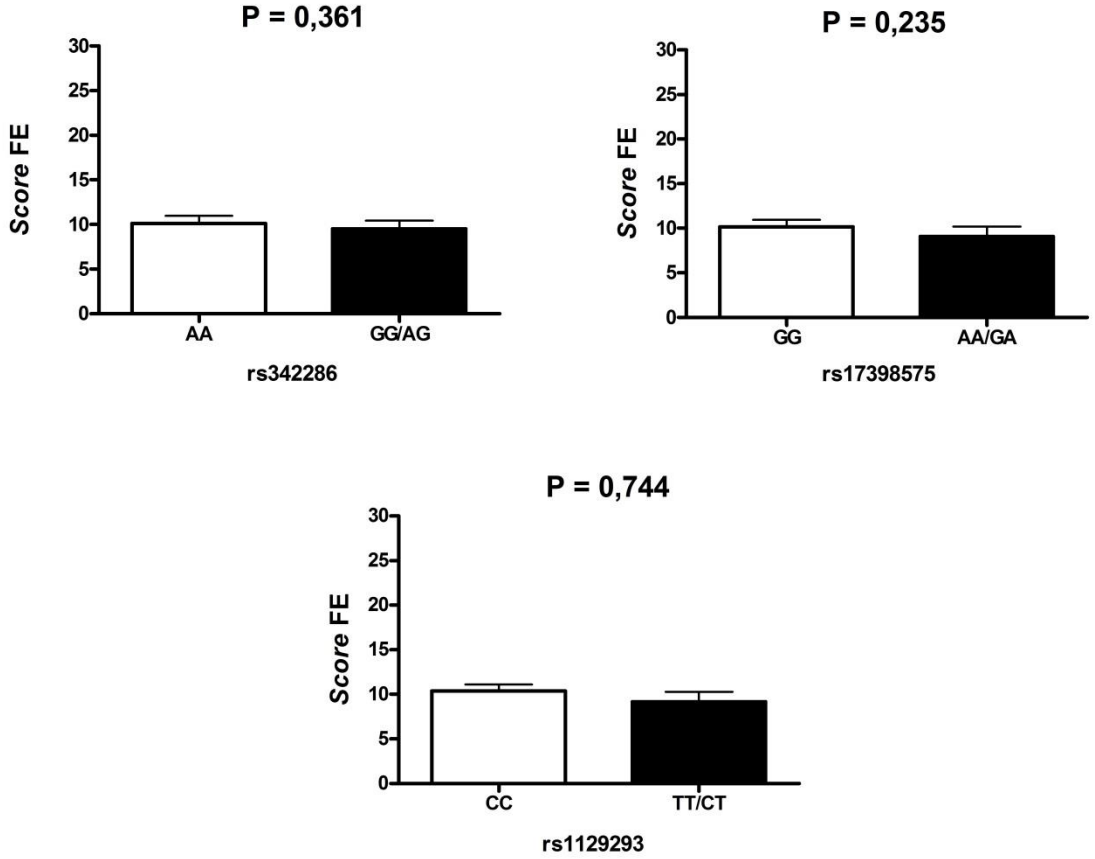
Na figura 9 estão apresentados os dados do *score* FE *versus* os haplótipos dos polimorfismos (rs342286, rs17398575 e rs1129293) do gene *PIK3CG*, os quais também não apresentaram diferença estatística significativa.

Figura 6 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo aditivo).



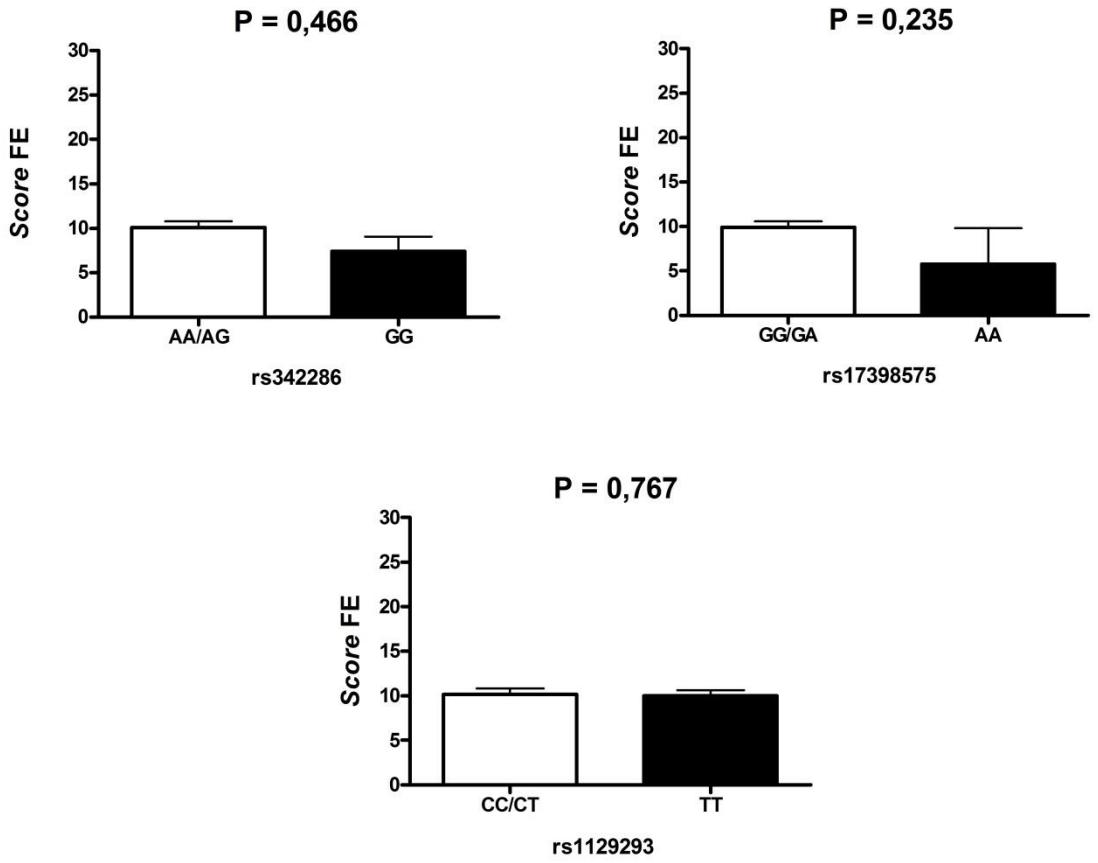
Valores do *score* de função erétil do IIEF expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 7 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo dominante).



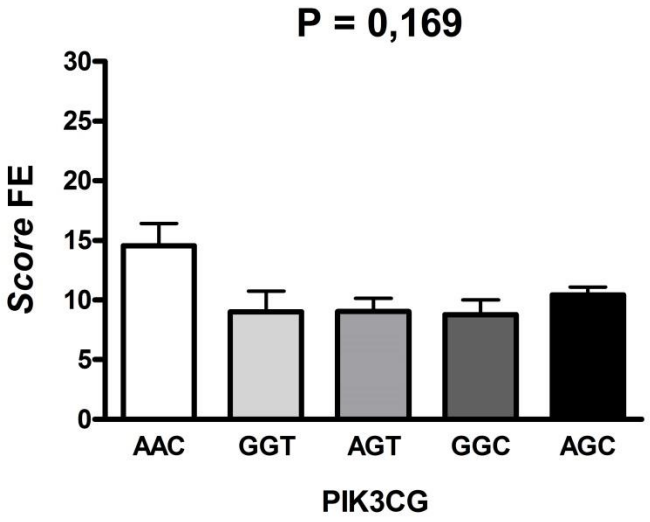
Valores do *score* de função erétil do IIEF expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student*.

Figura 8 – *Score* FE vs genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo recessivo).



Valores do *score* de função erétil do IIEF expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student*.

Figura 9 – *Score* FE vs haplótipos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC.



Valores do *score* de função erétil do IIEF expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Para uma maior confiabilidade dos resultados dos dados apresentados anteriormente, foi realizado uma regressão linear multivariada para todos os modelos (aditivo, dominante e recessivo) e para os haplótipos, mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados (rs342286, rs17398575 e rs1129293) para o gene *PIK3CG* e seus haplótipos sobre os valores do *score* FE do IIEF nos grupos de pacientes com DEC e controles. Estes dados estão apresentados nas tabelas 12, 13, 14 e 15, os quais não apresentaram diferença estatística significativa.

Tabela 12 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo aditivo).

Modelo		DEC (n = 112)		Controles (n = 106)	
		Aditivo		**Aditivo**	
		R^2 = 0,16		**R^2 = 0,05**	
		RMSE = 0,31		**RMSE = 0,15**	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<-0,01	0,033	<0,01	0,445
IMC		<-0,01	0,860	<-0,01	0,988
Ser hipertenso		-0,06	0,065	<0,01	0,875
Ser diabético		-0,02	0,561	0,01	0,754
Tabagismo					
Fumante		0,02	0,775	0,01	0,757
Ex-fumante		0,01	0,857	<-0,01	0,920
Não fumante		-0,04	0,504	<-0,01	0,819
Raça					
Brancos		<0,01	0,823	0,01	0,511
Não brancos		<-0,01	0,823	<-0,01	0,511
PIK3CG		**B**	**P**	**B**	**P**
rs342286	AA	0,06	0,192	-0,02	0,296
	AG	<-0,01	0,959	0,01	0,568
	GG	-0,06	0,343	0,01	0,690
		P Global = 0,425		**P Global =** 0,507	
rs17398575	GG	0,08	0,215	-0,01	0,659
	GA	0,08	0,354	<0,01	0,769
	AA	-0,16	0,226	<0,01	0,943
		P Global = 0,445		**P Global =** 0,851	
rs1129293	CC	0,03	0,635	-0,02	0,533
	CT	<-0,01	0,910	<0,01	0,742
	TT	-0,02	0,835	<0,01	0,854
		P Global = 0,845		**P Global =** 0,663	

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 13 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo dominante).

Modelo		DEC (n = 112)		Controles (n = 106)	
		Dominante		Dominante	
		R^2 = 0,14		R^2 = 0,05	
		RMSE = 0,31		RMSE = 0,15	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<-0,01	0,022	<0,01	0,418
IMC		<-0,01	0,905	<-0,01	0,987
Ser hipertenso		-0,06	0,081	<0,01	0,872
Ser diabético		-0,02	0,539	0,01	0,754
Tabagismo					
Fumante		0,03	0,711	0,01	0,747
Ex-fumante		0,01	0,867	<-0,01	0,922
Não fumante		-0,04	0,434	<-0,01	0,801
Raça					
Brancos		0,01	0,685	0,01	0,505
Não brancos		-0,01	0,685	-0,01	0,505
PIK3CG		**B**	**P**	**B**	**P**
rs342286	AA	0,03	0,317	-0,02	0,231
	GG+AG	-0,03	0,317	0,02	0,231
rs17398575	GG	0,02	0,569	<-0,01	0,567
	AA+GA	-0,02	0,569	<0,01	0,567
rs1129293	CC	0,02	0,440	-0,01	0,358
	TT+CT	-0,02	0,440	0,01	0,358

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 14 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles (modelo recessivo).

Modelo		DEC (n = 112)		Controles (n = 106)	
		Recessivo		Recessivo	
		R^2 = 0,15		R^2 = 0,02	
		RMSE = 0,31		RMSE = 0,15	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<-0,01	0,049	<0,01	0,419
IMC		<-0,01	0,894	<-0,01	0,990
Ser hipertenso		-0,06	0,045	<0,01	0,866
Ser diabético		-0,01	0,625	0,01	0,764
Tabagismo					
Fumante		0,03	0,690	<0,01	0,850
Ex-fumante		<0,01	0,910	<0,01	0,973
Não fumante		-0,04	0,449	<-0,01	0,766
Raça					
Brancos		<-0,01	0,942	0,01	0,320
Não brancos		<0,01	0,942	-0,01	0,320
PIK3CG		**B**	**P**	**B**	**P**
rs342286	GG	-0,04	0,350	<0,01	0,734
	AA+AG	0,04	0,350	<-0,01	0,734
rs17398575	AA	-0,11	0,247	<0,01	0,787
	GG+GA	0,11	0,247	<-0,01	0,787
rs1129293	TT	-0,03	0,692	0,02	0,639
	CC+CT	0,03	0,692	<-0,02	0,639

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 15 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene PIK3CG sobre os valores do score FE do IIEF nos grupos DEC e Controles.

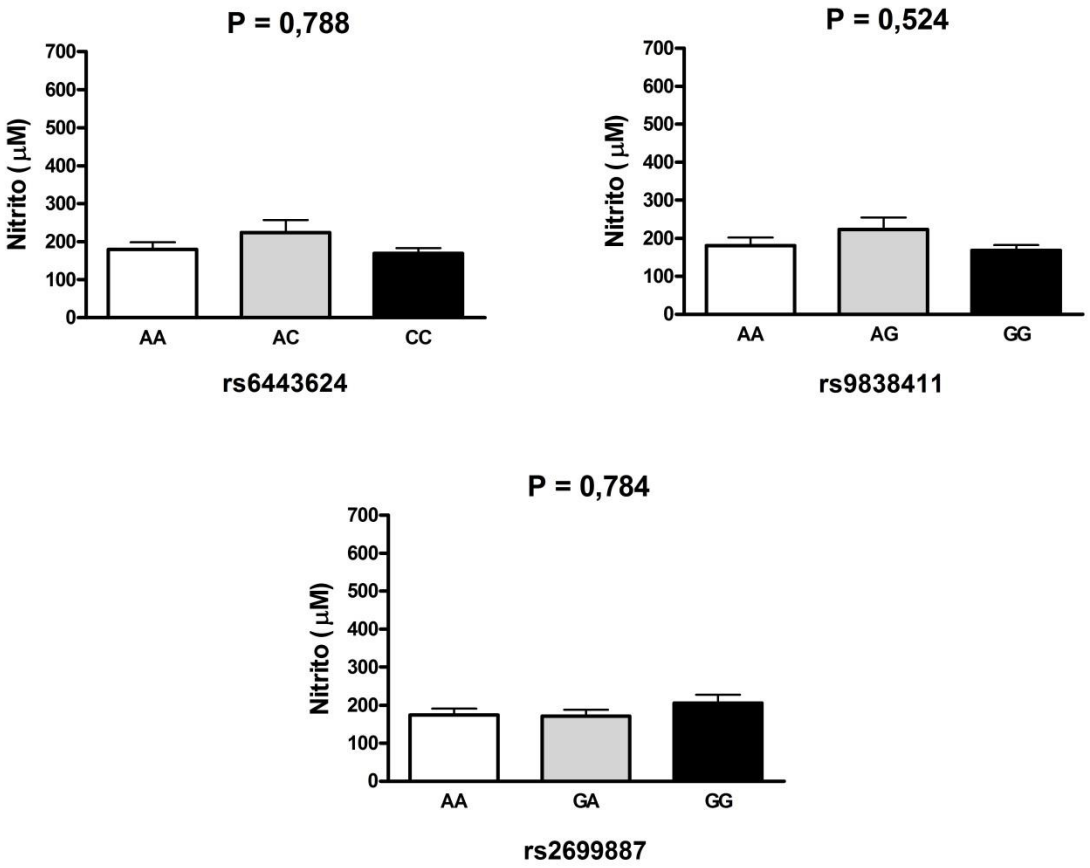
Modelo		**DEC (n = 196)**		**Controles (n = 193)**	
		R^2 = 0,17		**R^2 = 0,04**	
		RMSE = 0,29		**RMSE = 0,15**	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<-0,01	0,017	<0,01	0,212
IMC		<-0,01	0,557	<0,01	0,847
Ser hipertenso		-0,08	0,001	<0,01	0,975
Ser diabético		-0,02	0,447	<0,01	0,753
Tabagismo					
Fumante		0,05	0,397	0,01	0,755
Ex-fumante		-0,04	0,478	<-0,01	0,936
Não fumante		-0,01	0,711	<-0,01	0,793
Raça					
Brancos		<0,01	0,939	0,01	0,170
Não brancos		<-0,01	0,939	<-0,01	0,170
PIK3CG		**B**	**P**	**B**	**P**
	AGC	-0,01	0,727	-0,03	0,085
	GGC	-0,07	0,163	<0,01	0,868
	AGT	<0,01	0,948	0,01	0,685
	GGT	-0,09	0,129	0,01	0,669
	AAC	0,18	0,036	<0,01	0,899
		P Global = 0,212		**P Global =** 0,557	

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Nas figuras 10, 11 e 12 estão apresentados os dados da análise das concentrações plasmáticas de nitrito *versus* os genótipos dos polimorfismos estudados (rs6443624, rs9838411 e rs2699887) do gene *PIK3CA* para o grupo DEC, dividido em três modelos de análise: aditivo, dominante e recessivo. Estas não apresentaram diferença estatística significativa.

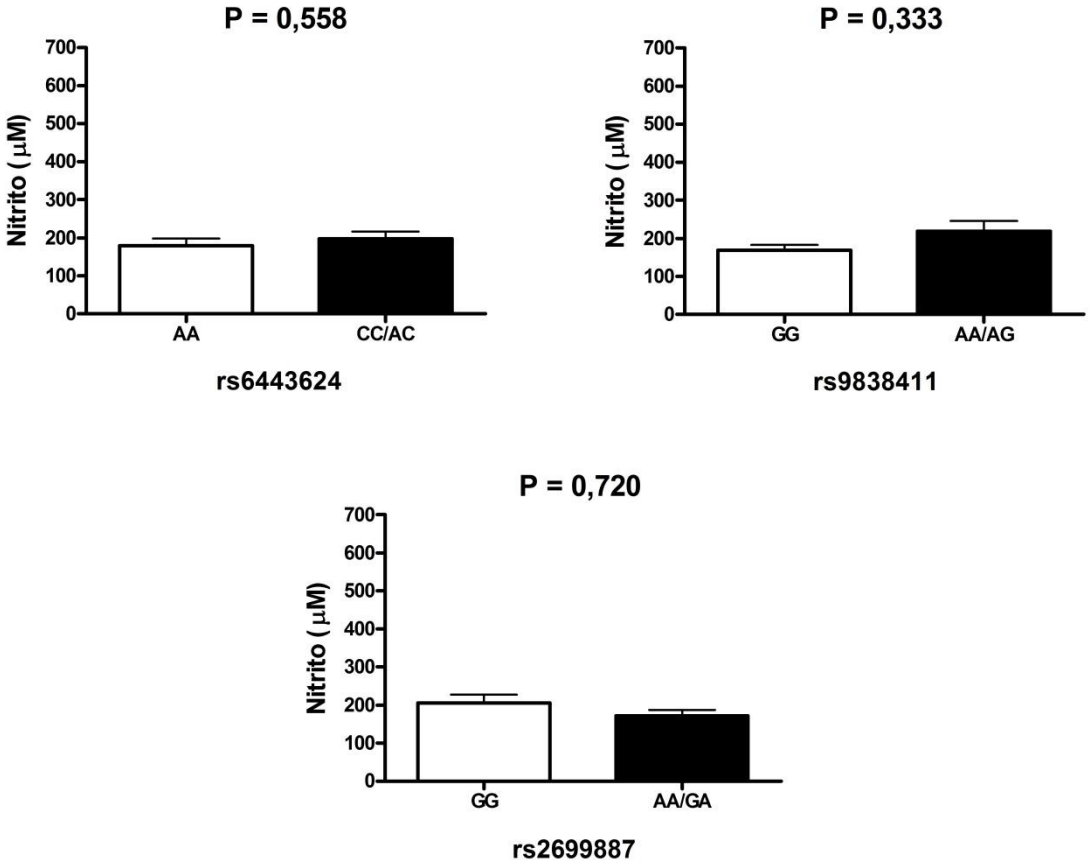
Na figura 13 estão apresentados os dados da análise das concentrações plasmáticas de nitrito *versus* os haplótipos dos polimorfismos estudados do gene *PIK3CA* para o grupo DEC, os quais também não apresentaram diferença estatística significativa.

Figura 10 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo aditivo).



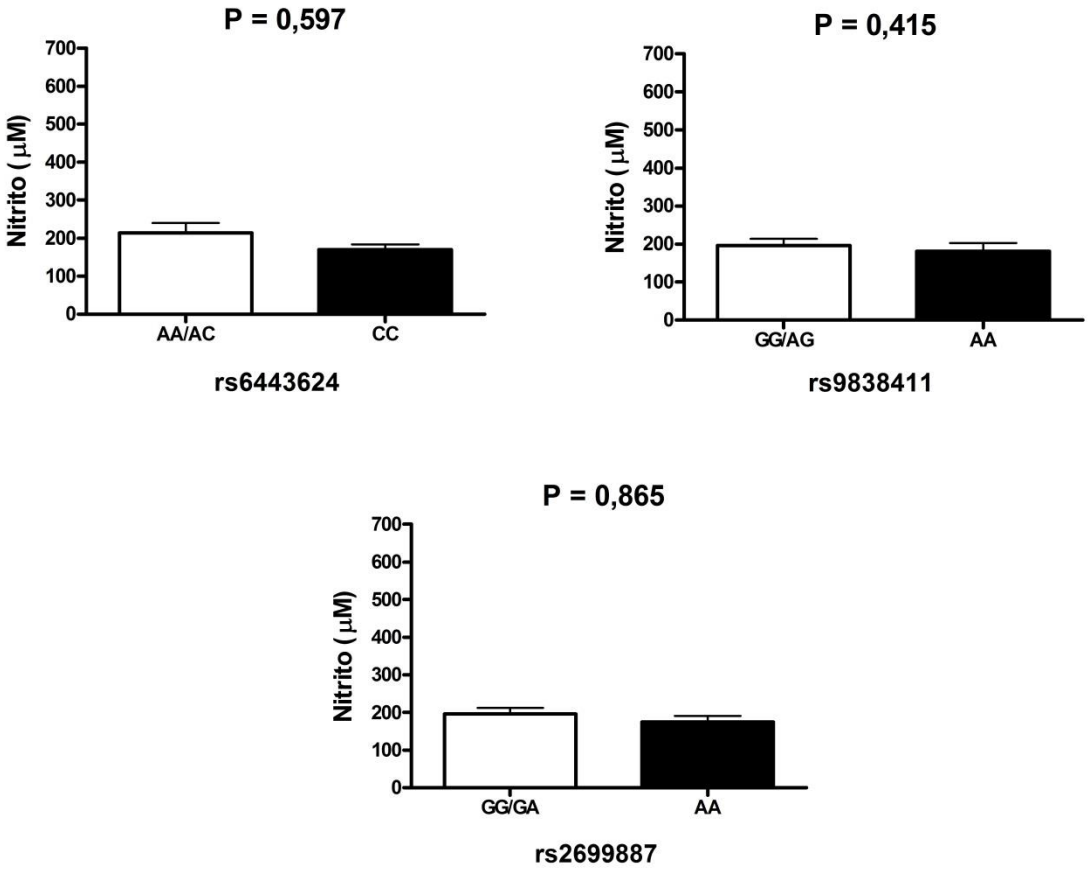
Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 11 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo dominante).



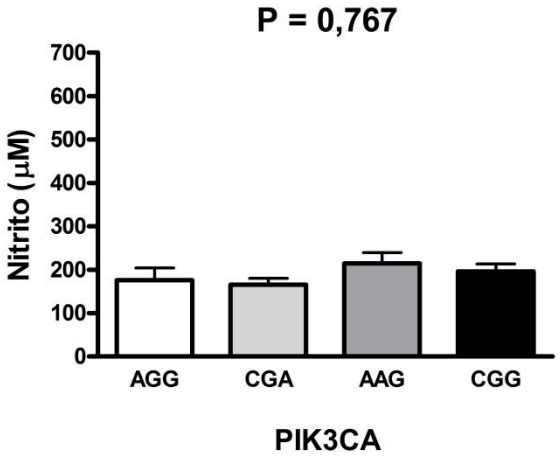
Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student.*

Figura 12 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC (modelo recessivo).



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student.*

Figura 13 - Nitrito *vs* haplótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo DEC.

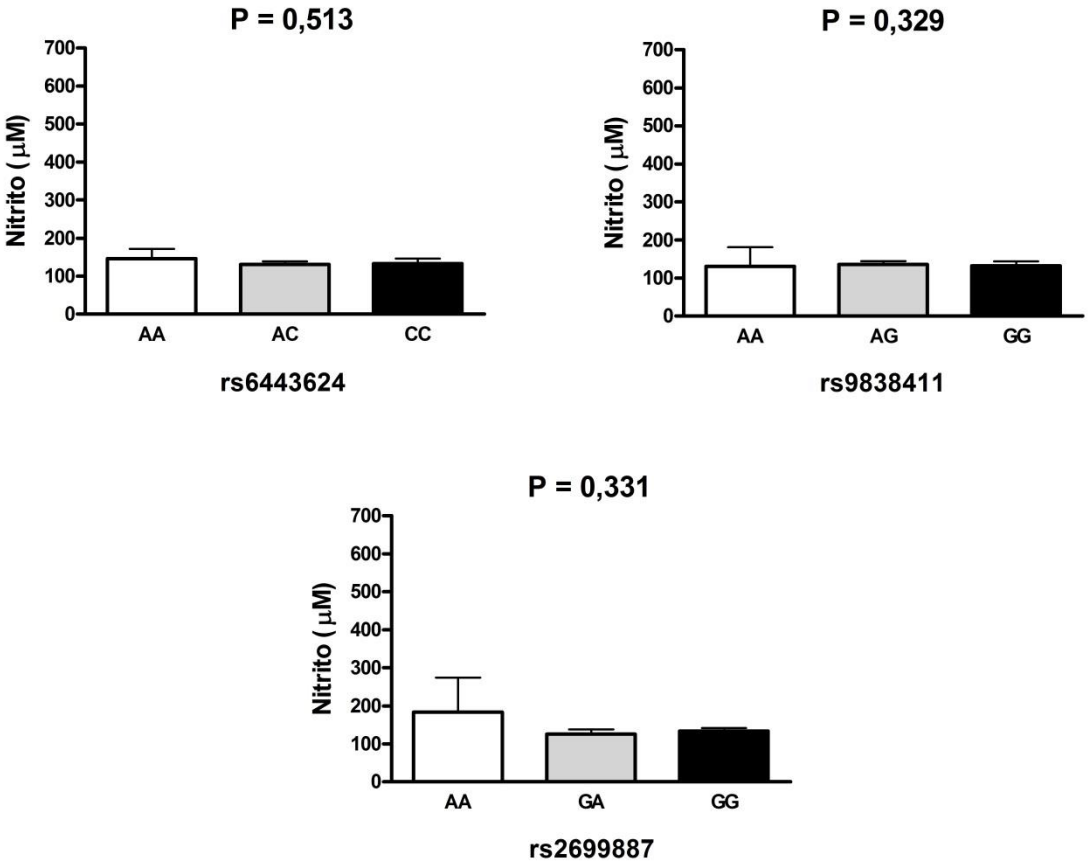


Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Nas figuras 14, 15 e 16 estão apresentados os dados da análise das concentrações plasmáticas de nitrito *versus* os genótipos dos polimorfismos estudados (rs6443624, rs9838411 e rs2699887) do gene *PIK3CA* para o grupo Controle, dividido em três modelos de análise: aditivo, dominante e recessivo. Estas não apresentaram diferença estatística significativa.

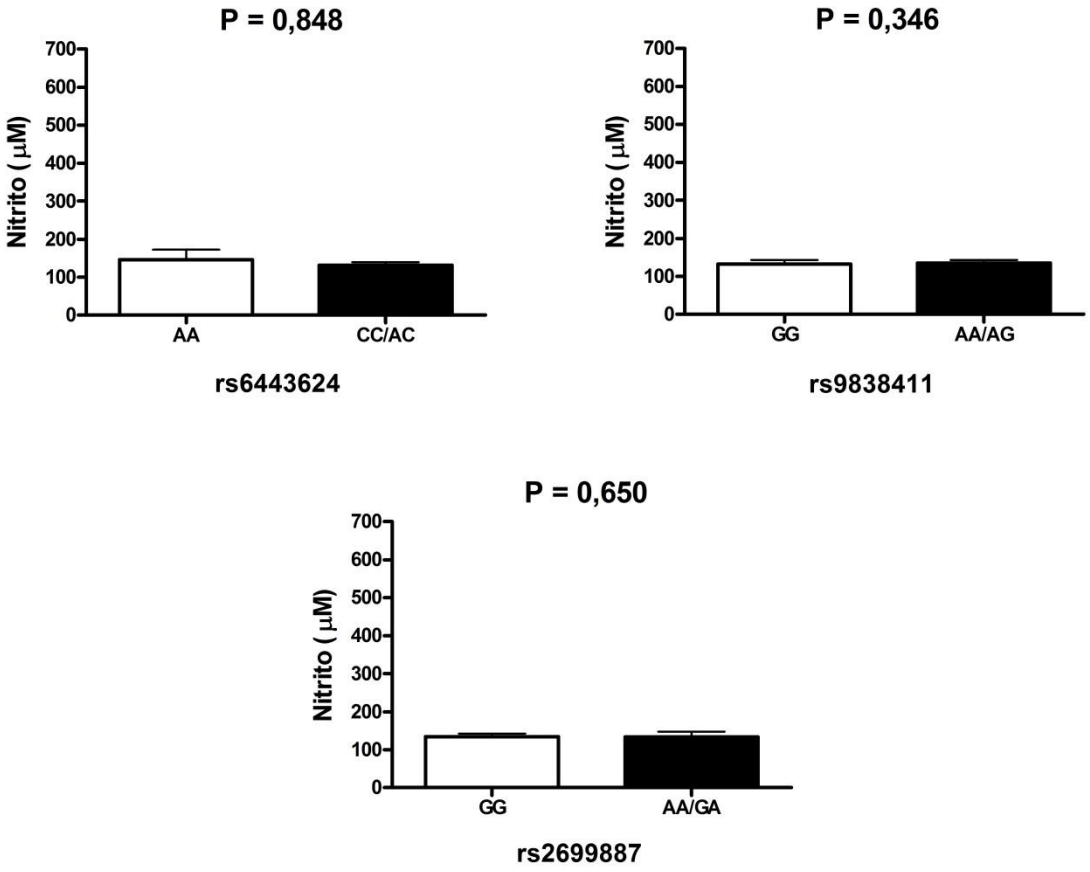
Na figura 17 estão apresentados os dados da análise das concentrações plasmáticas de nitrito *versus* os haplótipos dos polimorfismos estudados do gene *PIK3CA* do grupo Controle, os quais também não apresentaram diferença estatística significativa.

Figura 14 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo Controle (modelo aditivo).



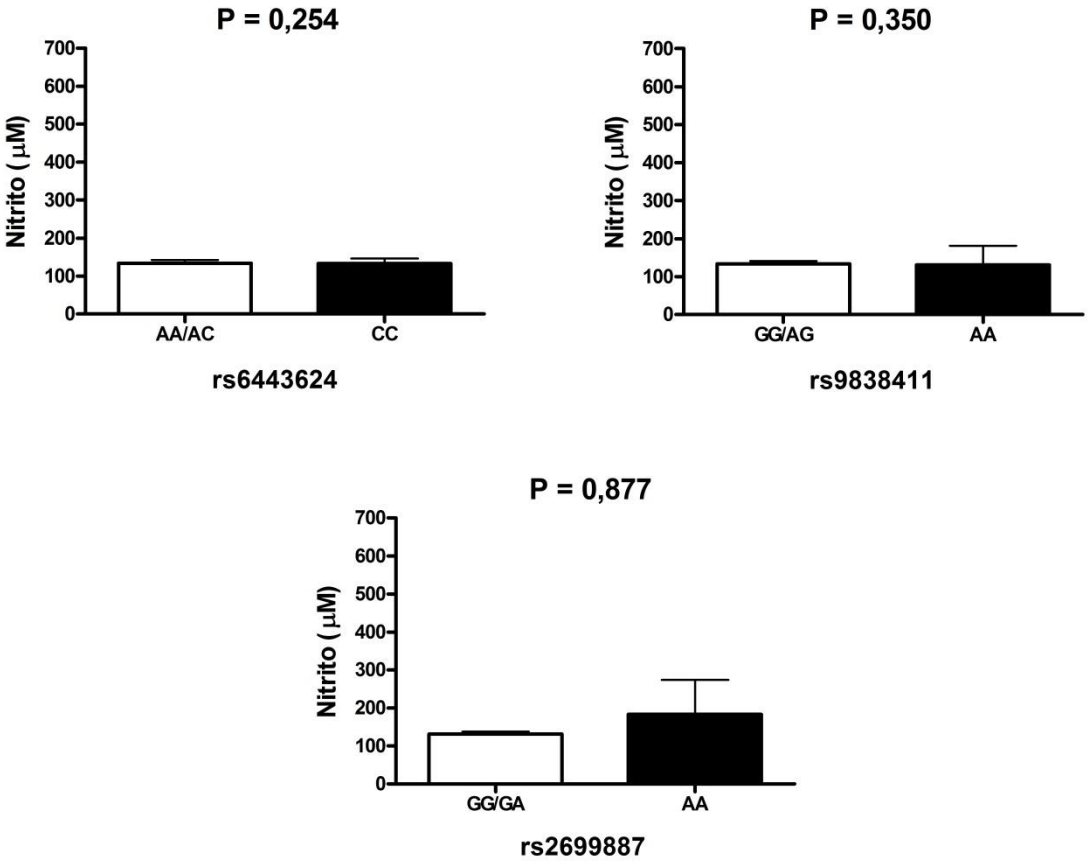
Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 15 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo Controle (modelo dominante).



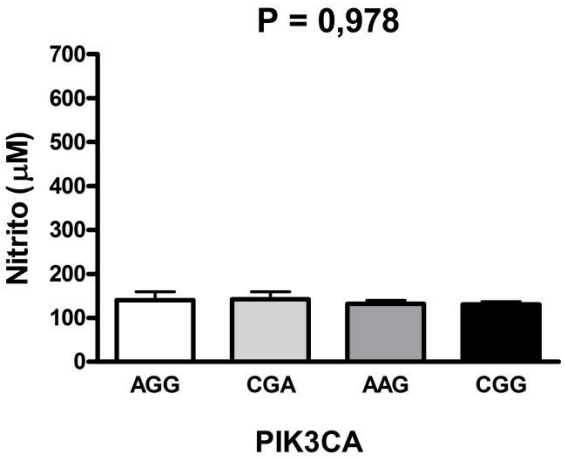
Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student.*

Figura 16 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo Controle (modelo recessivo).



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student.*

Figura 17 - Nitrito *vs* haplótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CA* para o grupo Controle.



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

Para uma maior confiabilidade dos resultados dos dados apresentados anteriormente, foi realizado uma regressão linear multivariada para todos os modelos (aditivo, dominante e recessivo) e para os haplótipos, mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados (rs6443624, rs9838411 e rs2699887) do gene *PIK3CA* e seus haplótipos sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos de pacientes com DEC e controles (tabelas 16, 17, 18 e 19), os quais não apresentaram diferença estatística significativa.

Tabela 16 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo aditivo).

		DEC (n = 111)		**Controles (n = 95)**	
Modelo		**Aditivo**		**Aditivo**	
		R^2 = 0,18		**R^2 = 0,08**	
		RMSE = 0,24		**RMSE = 0,18**	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<0,01	0,649	<-0,01	0,468
IMC		<-0,01	0,363	<-0,01	0,204
Ser hipertenso		0,09	<0,001	<0,01	<0,001
Ser diabético		-0,01	0,574	<-0,01	0,984
Tabagismo					
Fumante		-0,02	0,717	-0,07	0,183
Ex-fumante		0,08	0,122	0,14	0,058
Não fumante		-0,05	0,205	-0,07	0,114
Raça					
Brancos		-0,03	0,255	<-0,01	0,979
Não brancos		0,03	0,255	<0,01	0,979
PIK3CA		**B**	**P**	**B**	**P**
rs6443624	CC	0,03	0,688	-0,03	0,616
	AC	0,03	0,501	-0,02	0,584
	AA	-0,07	0,402	0,05	0,362
		P Global = 0,638		**P Global =** 0,614	
rs9838411	GG	-0,09	0,275	0,06	0,341
	AG	<-0,01	0,991	0,07	0,177
	AA	0,09	0,329	-0,13	0,128
		P Global = 0,544		**P Global =** 0,275	
rs2699887	GG	0,05	0,681	0,04	0,353
	GA	-0,02	0,731	0,04	0,381
	AA	-0,02	0,688	-0,08	0,290
		P Global = 0,916		**P Global =** 0,568	

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 17 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo dominante).

Modelo		DEC (n = 111)		Controles (n = 95)	
		Dominante		Dominante	
		R^2 = 0,18		R^2 = 0,04	
		RMSE = 0,23		RMSE = 0,18	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<0,01	0,662	<-0,01	0,682
IMC		<-0,01	0,389	<-0,01	0,274
Ser hipertenso		0,09	<0,001	<0,01	<0,001
Ser diabético		-0,01	0,594	<0,01	0,873
Tabagismo					
Fumante		-0,03	0,637	-0,04	0,411
Ex-fumante		0,08	0,107	0,09	0,190
Não fumante		0,05	0,234	-0,04	0,262
Raça					
Brancos		-0,03	0,230	<-0,01	0,945
Não brancos		0,03	0,230	<0,01	0,945
PIK3CA		**B**	**P**	**B**	**P**
rs6443624	AA	-0,02	0,545	<0,01	0,911
	CC+AC	0,02	0,545	<-0,01	0,911
rs9838411	GG	-0,05	0,073	-0,01	0,619
	AA+AG	0,05	0,073	0,01	0,619
rs2699887	GG	<-0,01	0,891	<0,01	0,752
	AA+GA	<0,01	0,891	<-0,01	0,752

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 18 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo recessivo).

Modelo		DEC (n = 111)		Controles (n = 95)	
		Recessivo		Recessivo	
		R^2 = 0,17		R^2 = 0,07	
		RMSE = 0,23		RMSE = 0,17	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<0,01	0,701	<-0,01	0,607
IMC		<-0,01	0,296	<-0,01	0,201
Ser hipertenso		0,09	<0,001	<0,01	<0,001
Ser diabético		-0,02	0,487	<0,01	0,902
Tabagismo					
Fumante		-0,04	0,521	-0,07	0,210
Ex-fumante		0,08	0,089	0,13	0,065
Não fumante		-0,04	0,305	-0,07	0,111
Raça					
Brancos		-0,03	0,199	<0,01	0,877
Não brancos		0,03	0,199	<-0,01	0,877
PIK3CA		**B**	**P**	**B**	**P**
rs6443624	CC	-0,04	0,124	-0,01	0,489
	AA+AC	0,04	0,124	0,01	0,489
rs9838411	AA	<0,01	0,902	-0,07	0,199
	GG+AG	<-0,01	0,902	0,07	0,199
rs2699887	AA	0,03	0,697	-0,06	0,287
	GG+GA	-0,03	0,697	0,06	0,287

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 19 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *PIK3CA* sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles.

Modelo		**DEC (n = 220)**		**Controles (n = 113)**	
		R^2 = 0,16		**R^2 = 0,02**	
		RMSE = 0,23		**RMSE = 0,14**	
		B	**P**	**B**	**P**
Idade		<0,01	0,641	<-0,01	0,602
IMC		<-0,01	0,068	<-0,01	0,073
Ser hipertenso		0,09	<0,001	<0,01	<0,001
Ser diabético		-0,01	0,392	<0,01	0,869
Tabagismo					
Fumante		-0,03	0,557	-0,04	0,203
Ex-fumante		0,07	0,035	0,09	0,040
Não fumante		-0,04	0,120	-0,05	0,079
Raça					
Brancos		-0,03	0,074	<-0,01	0,780
Não brancos		0,03	0,074	<0,01	0,780
PIK3CA		**B**	**P**	**B**	**P**
	CGG	-0,01	0,676	<-0,01	0,836
	AAG	0,03	0,279	<-0,01	0,909
	CGA	<-0,01	0,818	-0,02	0,393
	AGG	-0,01	0,812	0,03	0,381
		P Global = 0,661		**P Global =** 0,802	

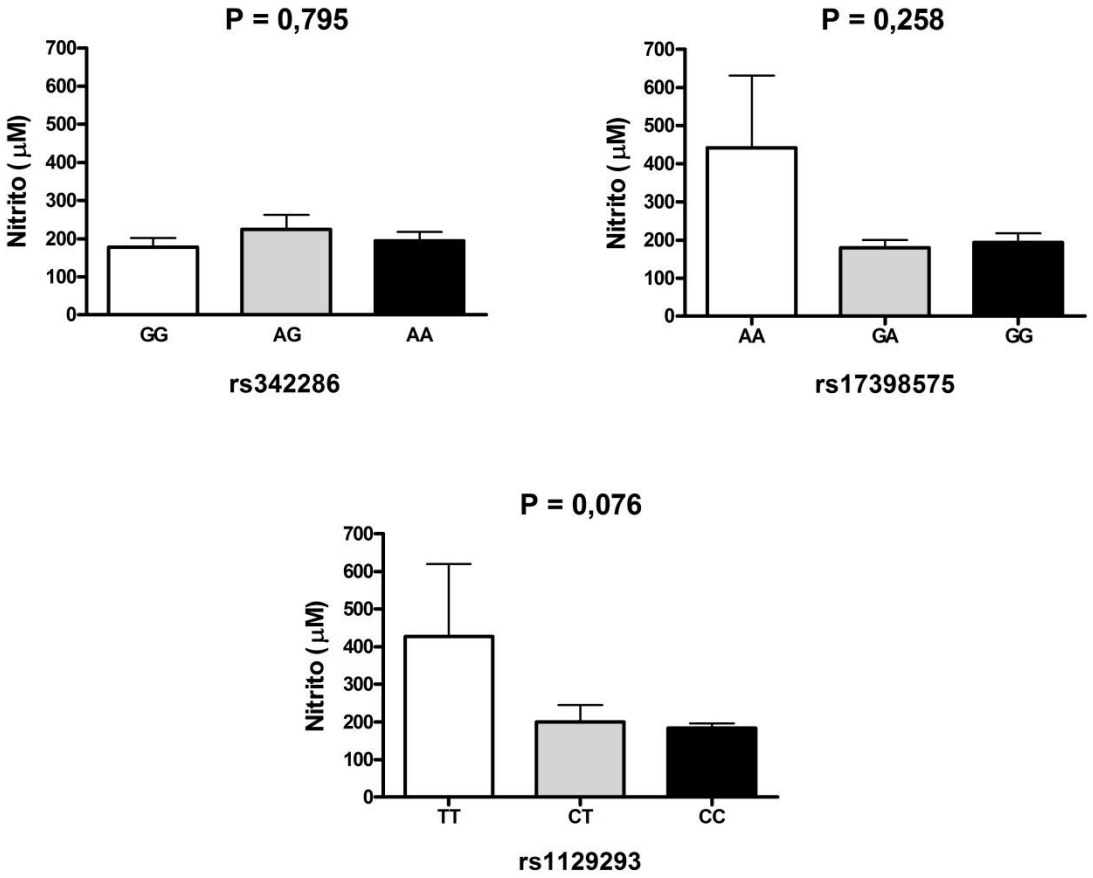
R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Nas figuras 18, 19 e 20 estão apresentados os dados da análise das concentrações plasmáticas de nitrito *versus* os genótipos dos polimorfismos estudados (rs342286, rs17398575 e rs1129293) do gene *PIK3CG* para o grupo DEC, dividido em três modelos de análise: aditivo, dominante e recessivo. Nas figuras 18 e 19, não foi possível observar a presença de diferença estatística significativa.

Na figura 20, o polimorfismo rs17398575 apresentou uma diferença estatística significativa, onde os pacientes com o genótipo GG/GA mostraram menores concentrações plasmáticas de nitrito comparado com os pacientes de genótipo GG. O mesmo ocorreu para o polimorfismo rs129293, pacientes com o genótipo CC/CT apresentaram menores valores de concentrações plasmáticas de nitrito comparado com os pacientes de genótipo TT.

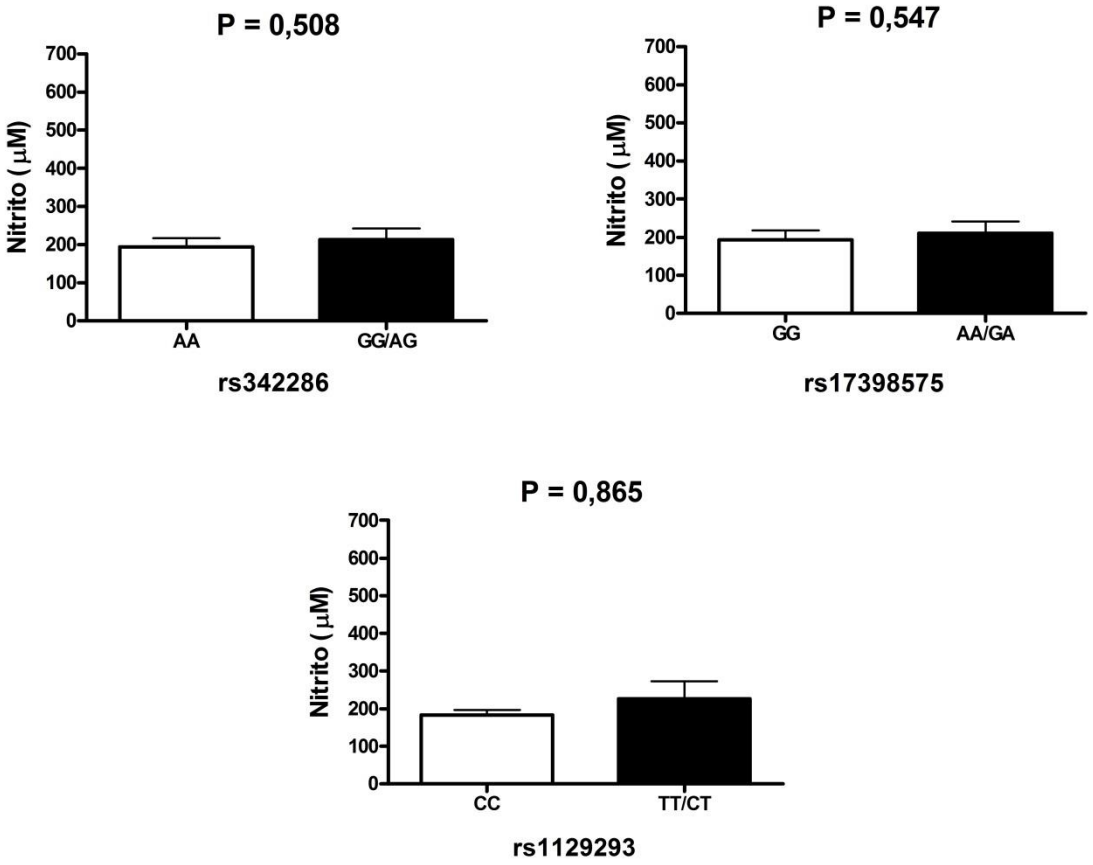
Na figura 21 estão apresentados os dados da análise das concentrações plasmáticas de nitrito *versus* os haplótipos dos polimorfismos estudados do gene *PIK3CG* para o grupo DEC, os quais não apresentaram diferença estatística significativa.

Figura 18 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo aditivo).



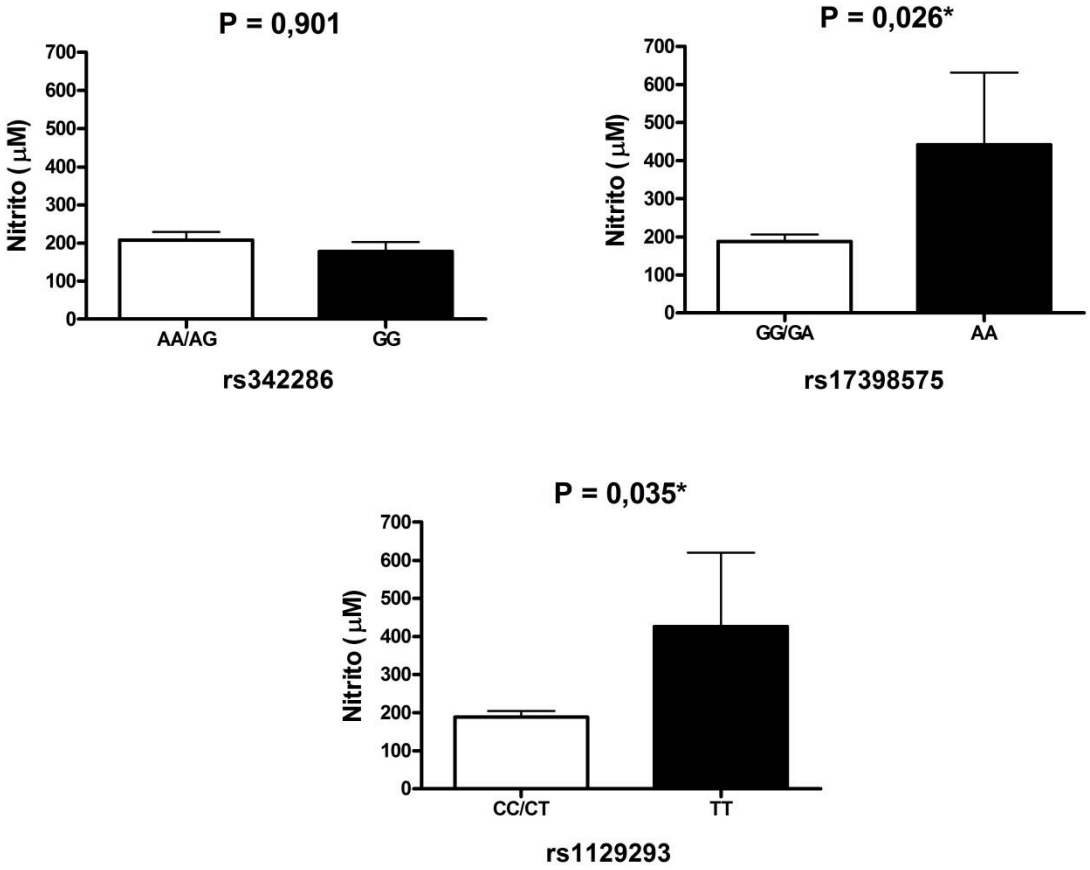
Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 19 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo dominante).



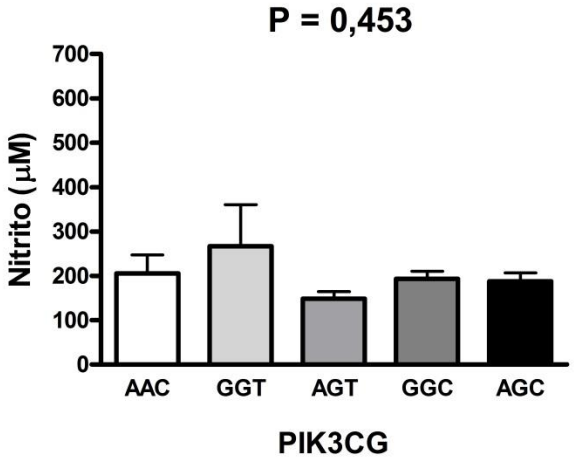
Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student.*

Figura 20 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC (modelo recessivo).



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student.*

Figura 21 - Nitrito *vs* haplótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo DEC.

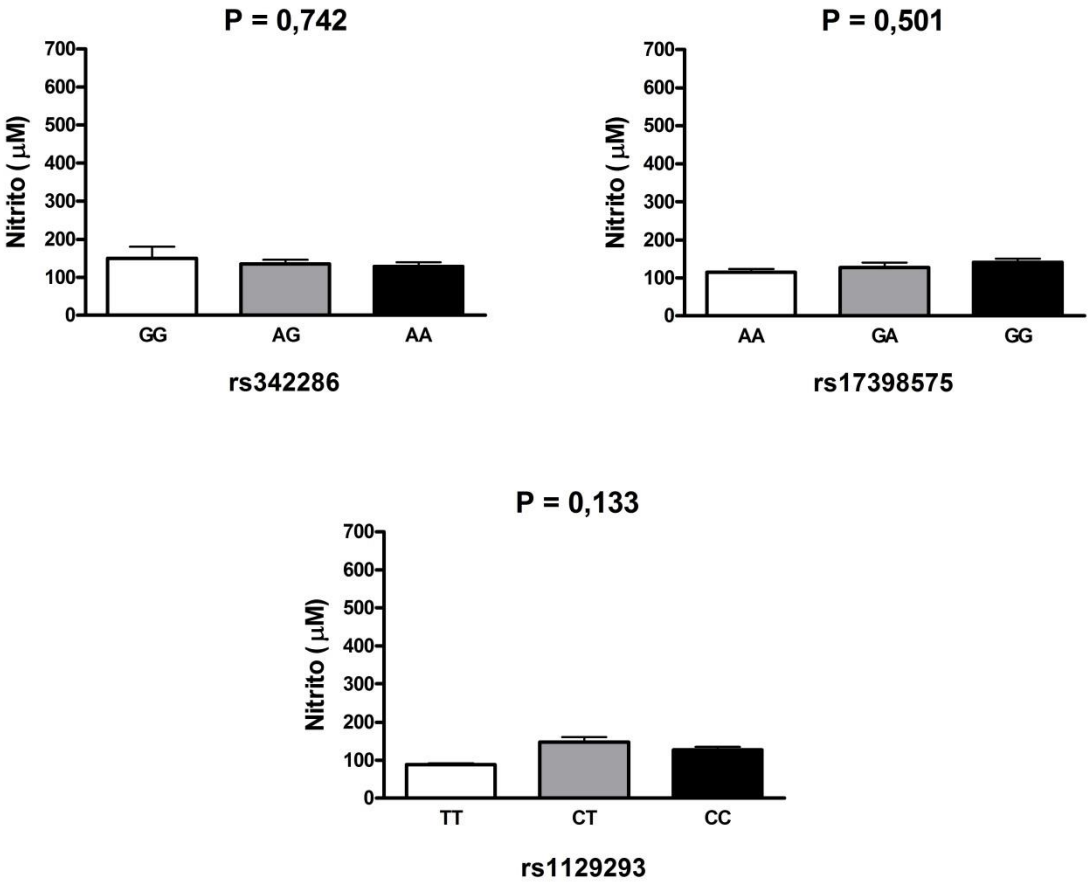


Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Nas figuras 22, 23 e 24 estão apresentados os dados da análise das concentrações plasmáticas de nitrito *versus* os genótipos dos polimorfismos estudados (rs342286, rs17398575 e rs1129293) do gene *PIK3CG* para o grupo Controle, dividido em três modelos de análise: aditivo, dominante e recessivo. Estas não apresentaram diferença estatística significativa. Porém vale ressaltar, para o modelo recessivo de análise (Figura 24), o rs1129293 apresentou uma tendência (P = 0,062) para uma possível diferença estatística significativa.

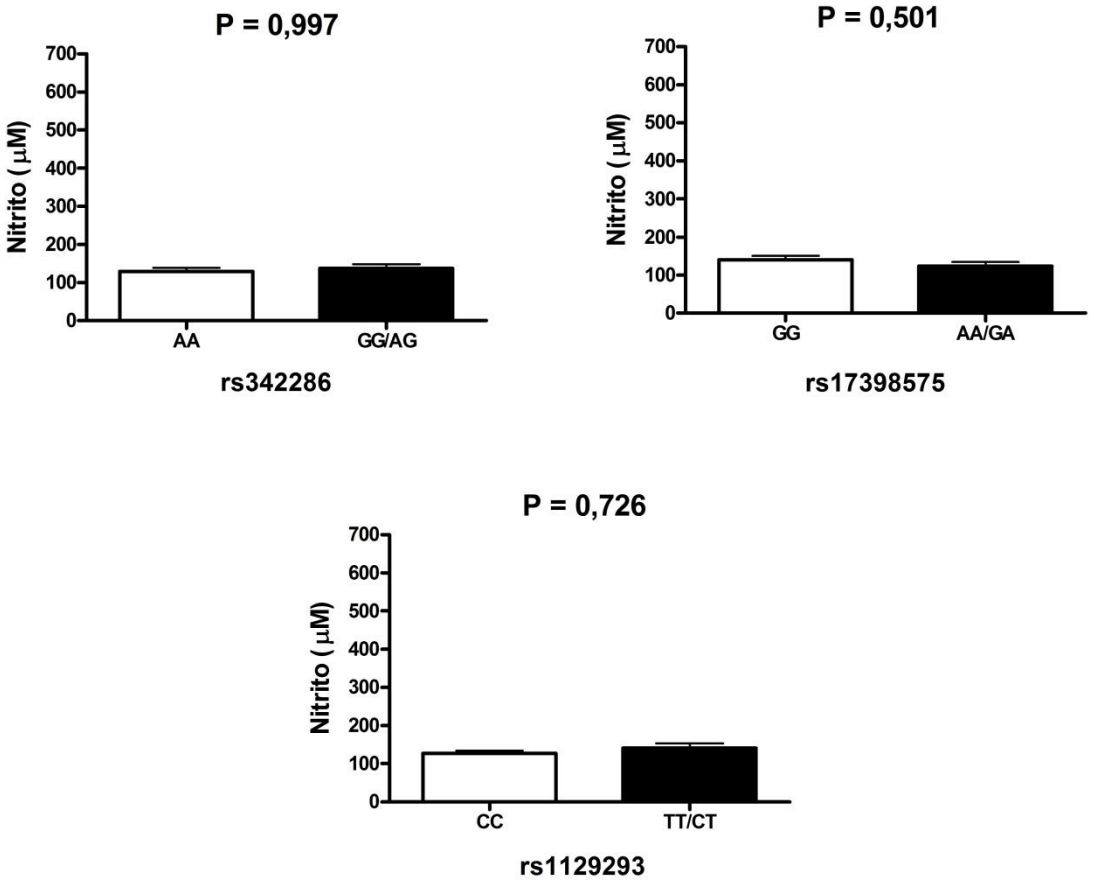
Na figura 25 estão apresentados os dados da análise das concentrações plasmáticas de nitrito *versus* os haplótipos dos polimorfismos estudados do gene *PIK3CG* do grupo Controle, os quais não apresentaram diferença estatística significativa.

Figura 22 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo Controle (modelo aditivo).



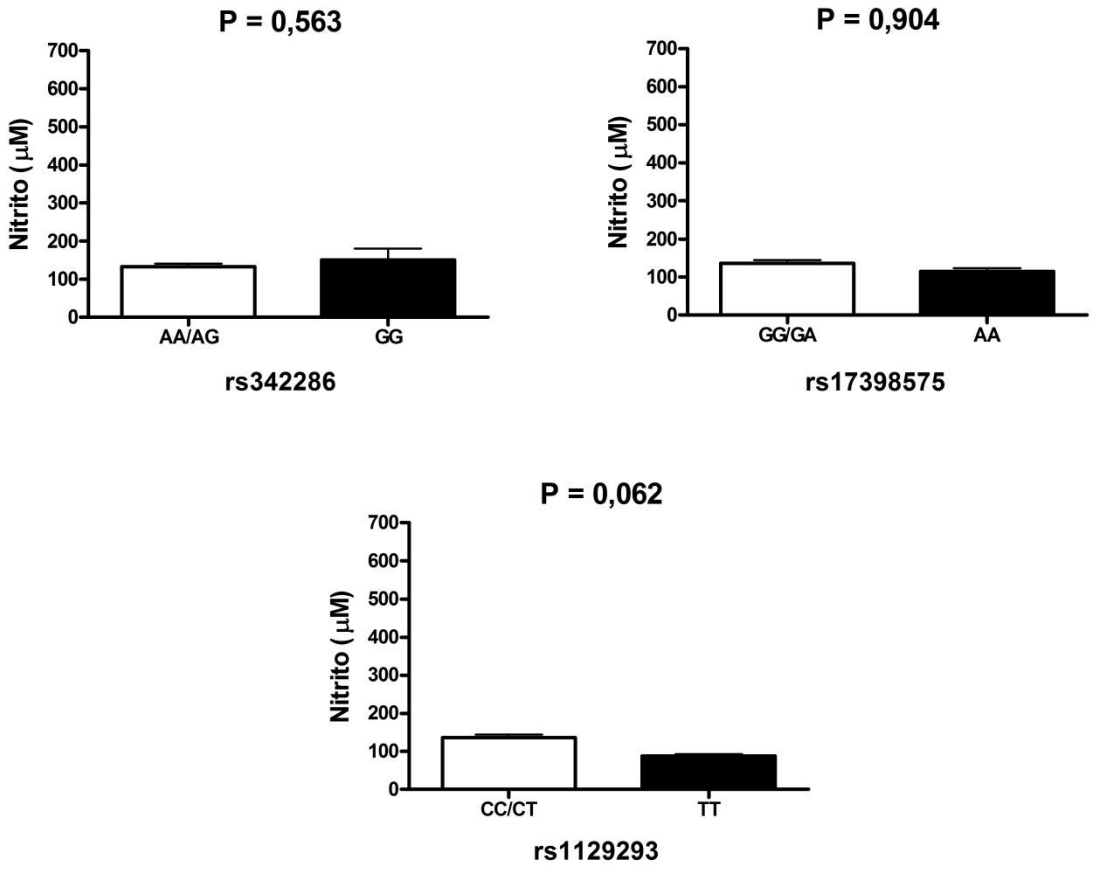
Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de pós-teste de Tukey.

Figura 23 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo Controle (modelo dominante).



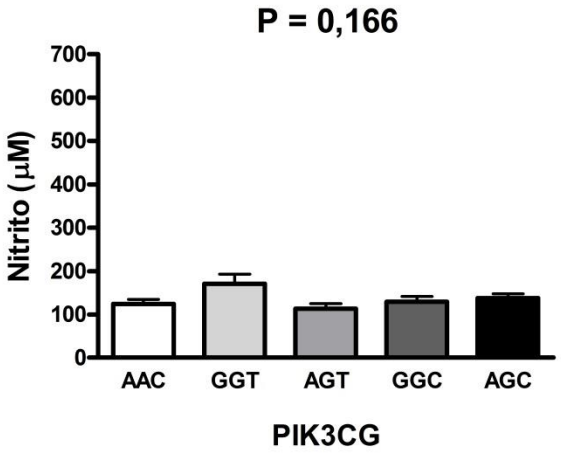
Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student.*

Figura 24 - Nitrito *vs* genótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo Controle (modelo recessivo).



Valores de concentração plasmática de nitrito expressos como média ± desvio padrão. Teste T de *Student.*

Figura 25 - Nitrito *vs* haplótipos dos polimorfismos do gene *PIK3CG* para o grupo Controle.



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

Para uma maior confiabilidade dos resultados dos dados apresentados anteriormente, foi realizado uma regressão linear multivariada para todos os modelos (aditivo, dominante e recessivo) e para os haplótipos, mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados (rs342286, rs17398575 e rs1129293) do gene *PIK3CG* e seus haplótipos sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos de pacientes com DEC e controles (tabelas 20, 21, 22 e 23).

Na tabela 20 o rs17398575 apresentou diferença estatística em todos os genótipos, mostrando que tanto o genótipo GG (P = 0,046) e o GA (P = 0,024) podem estar associados com uma diminuição das concentrações plasmáticas de nitrito, enquanto que o genótipo AA (P = 0,015) apresentou uma característica inversa, ou seja, está associado a um aumento dos níveis plasmáticos de nitrito. Vale ressaltar que ser hipertenso para esses dados, contribui de forma positiva.

Na tabela 22, o rs17398575 apresenta novamente uma diferença estatística significativa na análise do modelo recessivo, confirmando que realmente os indivíduos que apresentam o genótipo AA (P = 0,040), podem manifestar maiores níveis plasmáticos de nitrito comparado com os genótipos GG/GA, com o fator “ser hipertenso” contribuindo de forma positivo para esse dado.

Nas demais tabelas (21 e 23) as análises não apresentaram nenhuma diferença estatística significativa.

Tabela 20 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo aditivo).

Modelo		DEC (n =88)		Controles (n = 86)	
		Aditivo		**Aditivo**	
		R^2 = 0,33		**R^2 = 0,12**	
		RMSE = 0,22		**RMSE = 0,17**	
		B	**P**	**β**	**P**
Idade		<0,01	0,633	<-0,01	0,965
IMC		<-0,01	0,618	<-0,01	0,425
Ser hipertenso		0,09	<0,001*	<0,01	<0,001
Ser diabético		-0,02	0,314	0,04	0,416
Tabagismo					
Fumante		-0,02	0,748	<-0,01	0,912
Ex-fumante		0,09	0,092	0,09	0,189
Não fumante		-0,07	0,099	-0,08	0,055
Raça					
Brancos		-0,04	0,147	<0,01	0,937
Não brancos		0,04	0,147	<-0,01	0,937
PIK3CG		**B**	**P**	**β**	**P**
rs342286	AA	-0,05	0,165	-0,02	0,453
	AG	0,05	0,142	-0,02	0,503
	GG	<-0,01	0,971	0,04	0,311
		P Global = 0,167		**P Global =** 0,596	
rs17398575	GG	-0,11	0,046*	0,04	0,207
	GA	-0,14	0,024*	-0,02	0,602
	AA	0,25	0,015*	-0,02	0,683
		P Global = 0,049*		**P Global =** 0,377	
rs1129293	CC	-0,05	0,373	0,02	0,532
	CT	-0,08	0,177	0,06	0,079
	TT	0,13	0,202	-0,08	0,153
		P Global = 0,394		**P Global =** 0,212	

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados. * P <0,05 significativo.

Tabela 21 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo dominante).

Modelo		DEC (n = 88)		Controles (n = 86)	
		Dominante		Dominante	
		R^2 = 0,23		R^2 = 0,08	
		RMSE = 0,23		RMSE = 0,17	
		B	**P**	**β**	**P**
Idade		<0,01	0,525	<0,01	0,933
IMC		<-0,01	0,373	<-0,01	0,293
Ser hipertenso		0,09	0,001	<0,01	<0,001
Ser diabético		-0,02	0,413	0,04	0,428
Tabagismo					
Fumante		-0,02	0,765	-0,02	0,716
Ex-fumante		0,08	0,138	0,10	0,135
Não fumante		-0,06	0,155	-0,08	0,058
Raça					
Brancos		-0,06	0,032	<0,01	0,958
Não brancos		0,06	0,032	<-0,01	0,958
PIK3CG		**B**	**P**	**β**	**P**
rs342286	AA	-0,04	0,180	<-0,01	0,994
	GG+AG	0,04	0,180	<0,01	0,994
rs17398575	GG	-0,02	0,510	0,03	0,109
	AA+GA	0,02	0,510	-0,03	0,109
rs1129293	CC	<-0,01	0,869	-0,02	0,416
	TT+CT	<0,01	0,869	0,02	0,416

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

Tabela 22 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos genótipos dos polimorfismos estudados sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles (modelo recessivo).

Modelo		**DEC (n = 88)**		**Controles (n = 86)**	
		Recessivo		**Recessivo**	
		R^2 = 0,17		**R^2 = 0,09**	
		RMSE = 0,23		**RMSE = 0,17**	
		B	**P**	**β**	**P**
Idade		<0,01	0,840	<-0,01	0,694
IMC		<-0,01	0,589	<-0,01	0,510
Ser hipertenso		0,09	<0,001*	<0,01	<0,001
Ser diabético		-0,02	0,386	0,04	0,406
Tabagismo					
Fumante		-0,04	0,576	<-0,01	0,978
Ex-fumante		0,10	0,064	0,07	0,289
Não fumante		-0,07	0,129	-0,07	0,104
Raça					
Brancos		-0,03	0,249	<0,01	0,937
Não brancos		0,03	0,249	<-0,01	0,937
PIK3CG		**B**	**P**	**β**	**P**
rs342286	GG	<-0,01	0,935	0,04	0,210
	AA+AG	<0,01	0,935	-0,04	0,210
rs17398575	AA	0,15	0,040*	-0,02	0,549
	GG+GA	-0,15	0,040*	0,02	0,549
rs1129293	TT	0,11	0,142	-0,07	0,085
	CC+CT	-0,11	0,142	0,07	0,085

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados. * P <0,05 significativo.

Tabela 23 – Regressão linear multivariada mostrando o efeito dos haplótipos do gene *PIK3CG* sobre os valores das concentrações plasmáticas de nitrito nos grupos DEC e Controles.

Modelo		**DEC (n = 151)**		**Controles (n = 157)**	
		R^2 = 0,27		**R^2 = 0,06**	
		RMSE = 0,21		**RMSE = 0,17**	
		B	**P**	**β**	**P**
Idade		<0,01	0,535	<-0,01	0,839
IMC		<-0,01	0,204	<-0,01	0,237
Ser hipertenso		0,11	<0,001	<0,01	<0,001
Ser diabético		<-0,01	0,686	0,02	0,468
Tabagismo					
Fumante		-0,02	0,706	0,01	0,784
Ex-fumante		0,09	0,027	0,04	0,374
Não fumante		-0,07	0,022	-0,05	0,073
Raça					
Brancos		-0,04	0,021	<0,01	0,679
Não brancos		0,04	0,021	<-0,01	0,679
PIK3CG		**B**	**P**	**β**	**P**
	AGC	-0,01	0,619	<0,01	0,779
	GGC	0,05	0,245	<-0,01	0,908
	AGT	-0,12	0,020	-0,05	0,138
	GGT	0,07	0,182	0,07	0,030
	AAC	0,01	0,814	-0,02	0,483
		P Global = 0,135		**P Global =** 0,222	

R^2, parte da variabilidade explicada pelo modelo; RMSE, erro quadrático médio. Os valores do Score FE do IIEF foram logaritmicamente transformados.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos neste estudo foram:

a) No gene *PIK3CA*, o haplótipo AGG (referente aos polimorfismos rs6443624, rs9838411 e rs2699887) apresentou uma diferença estatística significativa, onde foi possível verificar a presença de um menor risco para o desenvolvimento de DE para os indivíduos que apresentaram este haplótipo;

b) Ainda para o gene *PIK3CA*, na análise do *score* FE com os genótipos dos polimorfismos estudados, especificamente na análise do modelo dominante, no polimorfismo rs9838411, os pacientes com DEC com presença do genótipo GG possuem uma melhora na pontuação do domínio FE do IIEF comparado com os pacientes com DEC com presença do genótipo GA/AA. Esses resultados foram confirmados na análise de regressão linear multivariada para o modelo aditivo, onde os pacientes com DEC com presença do genótipo AA apresentaram uma piora da DE.

c) Não foram encontradas associações dos polimorfismos da *PI3KCA* com nitrito plasmático.

d) No gene *PIK3CG*, os pacientes DEC que carregam o haplótipo AAC (referente aos polimorfismos rs342286, rs17398575 e rs1129293) podem apresentar um menor risco para o desenvolvimento de DE, enquanto que especificamente para cada polimorfismo estudado para este gene não foi possível observar uma associação de risco para DE.

e) Na análise das concentrações plasmáticas de nitrito com os genótipos, especificamente no modelo recessivo da análise, no polimorfismo rs17398575, os pacientes DEC com presença dos genótipos GG/GA possuem valores menores de nitrito comparado com os pacientes com o genótipo AA. Esses resultados foram confirmados nas análises de regressão linear multivariada, tanto para o modelo aditivo, quanto para o modelo recessivo.

f) Ainda para o gene *PIK3CG* vale destacar uma associação próxima à significância presente na análise das concentrações plasmáticas de nitrito com o genótipos para o grupo controle, especificamente no polimorfismo rs1129293 (P = 0,062), os indivíduos saudáveis com a presença do genótipo

CC/CT apresentaram valores maiores de nitrito comparado com os indivíduos saudáveis com a presença do genótipo TT.

O envolvimento da PI3K já está bem estabelecido na literatura no âmbito do contexto de câncer humano: sua hiperatividade por meio da via PI3K/ AKT/ mTOR traz um efeito de desregulação substancial nas funções celulares normais, ocasionando alterações celulares, o que pode levar ao desenvolvimento do câncer humano[26; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69]. Especificamente o gene *PIK3CA* participa da tumorigênese e no processo de desenvolvimento de cânceres como um oncogene[70; 71]. Além do alto envolvimento da PI3K com pesquisas relacionadas ao câncer, alguns estudos trazem que a PI3K pode atuar como mediadora a uma contração induzida por agonista (Wortmannin e LY294002), em vários tipos de músculo liso[72; 73; 74]. Outro dado importante é que a expressão cardíaca especifica da p110α (codificada pelo gene *PIK3CA*), quando ativa, aumenta o tamanho do coração, e se ocorrer inversamente, a expressão negativa reduz significativamente o volume cardíaco[75]. Portanto, é possível que resultados observados em câncer sejam relevantes e transponíveis para o contexto cardiovascular.

Parmar e colaboradores (2013)[76], a fim de investigarem a correlação que poderia existir entre a variação genética dentro da via EGFR/ PI3K/ AKT1 com a ocorrência de toxicidade associada ao tratamento com EGFRI (inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico), com câncer colorretal e/ou câncer de pulmão, avaliaram em 109 pacientes (73 homens e 36 mulheres) os haplótipos referentes aos polimorfismos rs9831234, rs2699905, rs6443624, rs2677760 e rs2459693 do gene *PIK3CA*. Eles observaram uma consistente associação dos polimorfismos com toxicidade cutânea e a sobrevivência dos indivíduos, onde os pacientes portadores do haplótipo AGCTT apresentaram uma pior sobrevida, porém com menos toxicidade cutânea. Ainda sugerem que a variação genética presente no gene *PIK3CA* pode modular a atividade da PI3K. É difícil transpor os resultados desse estudo ao nosso contexto, já que dos polimorfismos avaliados no estudo de Pamar, somente avaliamos o rs6443624 aqui, e nesse caso, o haplótipo mencionado continha o alelo ancestral desse polimorfismo.

Em outro estudo, Li e colaboradores (2015)[77], exploraram a relação entre os polimorfismos rs17849071 e rs17849079 do gene *PIK3CA* com a vulnerabilidade ao carcinoma hepatocelular em uma população chinesa (150 pacientes com carcinoma

hepatocelular – 89 homens e 61 mulheres), e também encontraram uma possível associação do haplótipo GT, em que este apresentou um aumento de risco para o carcinoma hepatocelular. Ou seja, novamente a ideia dos alelos variantes dos polimorfismos estudados levando a um ganho de função da via. No nosso trabalho encontramos uma associação do haplótipo AGG (referente aos polimorfismos rs6443624, rs9838411 e rs2699887, combinando os três alelos variantes de cada polimorfismo) com um maior risco para o desenvolvimento de DE, ou seja, os indivíduos que apresentam este haplótipo podem estar mais suscetíveis para desenvolver a DE, consequentemente uma piora de sua saúde sexual. Como mencionado anteriormente, realmente as variações genéticas presentes no gene *PIK3CA*, podem modular a atividade da PI3K, modulando sua função.

Segundo Bizhani e colaboradores (2018)[56], o polimorfismo rs6443624 (*PIK3CA*) pode estar relacionado ao desenvolvimento de câncer de bexiga em uma amostra da população iraniana (235 pacientes com câncer de bexiga – 193 homens e 40 mulheres; 255 indivíduos sem câncer como controle – 210 homens e 42 mulheres), especificamente o alelo A, causando um declínio significativo no risco (CA vs CC: OR = 0,44, IC 95% = 0,30-0,65, P = <0,001; AA vs CC: OR = 0,35, IC 95% = 0,16-0,78, P = 0,010; A vs C: OR = 0,60, IC 95% = 0,46-0,79, P = <0,001) para desenvolver este tipo de câncer. Em outro estudo[78], pacientes com carcinoma de células renais que apresentavam o genótipo AC ou AA para o polimorfismo rs6443624, mostraram um aumento de duas vezes a mais de risco para a progressão da doença, comparado com os pacientes com o genótipo CC, ou seja, os autores concluíram que o rs6443624 está significativamente associado com a sobrevivência em pacientes com carcinoma de células renais. Se considerarmos que a proliferação celular seria diretamente relacionada a maior função da PI3K, poderia se sugerir que os genótipos variantes levariam a um ganho de função dessa via no contexto do câncer, o que poderia se reproduzir no contexto da produção de NO.

Em nosso estudo foi possível observar uma associação presente no polimorfismo rs6443624, especificamente para a análise do modelo recessivo, com relação a pontuação do domínio FE do IIEF. Os pacientes DEC que possuem o genótipo CC apresentaram uma melhora na pontuação da FE, comparado com os que possuem os genótipos AC/AA. De forma interessante, mostramos no passado

maiores níveis de nitrito em pacientes, quando comparado aos controles (Tabela 1)[79].

Devido a isso, pode-se pensar que o genótipo AA está causando um ganho de função da via PI3K, uma vez que, ativada (PI3K/ AKT/ eNOS) há a fosforilação da eNOS[27; 28] e consequentemente o aumento da produção de NO. Uma vez que esta via pode sofrer dessensibilização quando ativada cronicamente[80], é possível que uma maior produção tônica de NO leve a dessensibilização da via e torne os pacientes mais suscetíveis à DE. Com isso o genótipo AA aumentando o risco para DE, tende a diminuir o relaxamento vascular. Este resultado é de suma importância para uma possível orientação a estudos que utilizam o gene *PIK3CA* como um oncogene, pois é de imprescindível observar quais consequências clínicas a hiperatividade e/ou inibição da PI3K pode causar no indivíduo. Vale alertar ainda, o quanto a hiperatividade ou a inibição deste gene, ao mesmo tempo beneficiando determinados canceres do sistema geniturinário, pode provocar piora ou melhora em sintomas clínicos no desenvolvimento da DE.

Vale ressaltar que especificamente o haplótipo AGG, referente aos polimorfismos rs6443624, rs9838411 e rs2699887 do gene *PIK3CA*, e o haplótipo AAC, referente aos polimorfismos rs342286, rs17398575 e rs1129293 do gene *PI3KCG*, apresentaram um menor risco para o desenvolvimento de DE, porém não há na literatura nenhum estudo referente a haplótipos destes genes. O que é interessante no caso do haplótipo AGG do *PI3KCA* é o fato de que a única diferença entre o haplótipo protetor e o ancestral é a troca de A>C correspondente à primeira posição, ou seja, o rs6443624. O genótipo CC apresentou maior score FE (Figura 4), o que é condizente com o efeito protetor contra a disfunção erétil reportado na avaliação do haplótipo.

Outro resultado importante que encontramos ainda para o gene *PIK3CA* foi a associação do *score* FE do IIEF com o polimorfismo rs9838411 na análise do modelo dominante, em que consiste que os pacientes com a presença do genótipo GG possuem uma melhor pontuação no domínio FE comparado com o genótipo GA/AA, e isto se confirma após a analise corrigida dos dados (fatores de confusão: idade, IMC, diabetes, hipertensão, tabagismo e raça), onde os pacientes DEC que apresentaram o genótipo AA mostraram uma piora da DE. De forma interessante, na análise da associação desse polimorfismo com a DE, o valor de P é próximo a

significância (0.087), com frequência numericamente maior desse genótipo nos pacientes (Tabela 4).

O papel da *PI3KCG* é diferente da *PI3KCA*, sendo mais relacionado com a imunidade. Além disso, a PI3Kγ é expressa principalmente em leucócitos e células do sistema cardiovascular e realiza um papel sinalizador de grande importância nas respostas inflamatórias[81]. De fato, em camundongos null-*PK3CG* o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para sítios inflamatórios é prejudicado, e além disso, as células dendríticas mostram uma capacidade reduzida em transportar o antígeno externo para os nódulos linfáticos[82; 83]. Ou seja, a inativação da *PIK3CG*, em camundongos reduz radicalmente as respostas inflamatórias[84]. Pela *PIK3CG* estar envolvida mais em processos inflamatórios, as associações das variáveis de concentração de nitrito plasmático com os polimorfismos da *PIK3CG* (descritos a seguir), fazem sentido quando avaliamos a produção de NO envolvida nos processos inflamatórios via INOS (NO sintase induzível). Considerando estas questões, e o fato de que pacientes tem maiores níveis de nitrito que os controles, sugerimos que uma porção importante do nitrito plasmático pode ter origem inflamatória.

Vale ressaltar que a *PIK3CG*, em vários estudos, vem sendo destacada em exercer um papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, infarto do miocárdio e trombrose[85; 86]. Por isso ela também está expressa em cardiomiócitos, células endoteliais, fibroblastos e células do músculo liso[87]. Com a ativação da *PIK3CG*, devido ao aumento da captação de glicose, pode-se aumentar a síntese de glicogênio cardíaco, como consequência do aumento da contração miocárdica, ou seja, a ativação da *PIK3CG* é suficiente para aumentar a oxidação de ácidos graxos no miocárdio[88].

Li e colaboradores[60], a fim de investigar o papel dos polimorfismos rs1129293 e rs17398575 da *PIK3CG* na capacidade de resposta do paciente ao clopidogrel (antagonista do receptor de ADP que inibe a agregação plaquetária) para avaliar os riscos de isquemia em pacientes com doença cardíaca coronariana (DCC). Foram avaliados 513 pacientes com DCC, divididos em dois grupos, os resistentes ao clopidogrel (CR – 79 homens e 22 mulheres) com taxas de agregação plaquetária ≥70% e os sensíveis ao clopidogrel (CS – 320 homens e 92 mulheres) com taxas de agregação plaquetária <70%. Os resultados trazem que os pacientes com o

genótipo TT do rs1129293 e genótipo GG do rs17398575 apresentaram maior risco de ocorrência de isquemia em comparação com os outros genótipos, além disso, os genótipos CT+TT do rs1129293 e GA+GG do rs17398575 podem ser fatores de risco para CR.

No presente estudo, para o *PIK3CG*, no polimorfismo rs17398575, os pacientes com DEC que apresentaram o genótipo GG/GA mostraram valores menores de concentrações plasmáticas de nitrito comparado com o genótipo AA. Ainda, vale destacar, que em contrapartida, no grupo controle para o polimorfismo rs1129293 foi possível observar uma associação próxima à significância, onde os indivíduos saudáveis que apresentaram o genótipo CC/CT mostraram valores de concentrações plasmáticas de nitrito maiores comparado com o genótipo TT. A relação entre estes genótipos e o fenótipo cardiovascular não é clara. Uma forma de avaliar seria que se no genótipo AA (rs17398575) e no genótipo TT (rs1129293) há maiores valores de concentrações plasmáticas de nitrito, poderia haver maior relaxamento dos vasos, mas como já demonstramos anteriormente, esse efeito também é susceptível a dessensibilização da via da guanilato ciclase solúvel. Li e colaboradores[60] trazem que o genótipo TT (rs1129293) está associado a aumento para o risco para isquemia. Isto poderia ser explicado, segundo Hemerich e colaboradores[89], pelo fato de que o genótipo TT (rs1129293) está associado à redução do colesterol de lipoproteína de alta intensidade (HDL), e dessa forma seria prejudicial para a saúde cardiovascular[90]. Mais estudos são necessários para melhor entender o impacto da função da PI3KCG sobre a produção endotelial de NO (eNOS) e sobre a produção de NO por linfócitos no contexto inflamatório (iNOS).

A miscigenação da população brasileira é destacada neste estudo como uma variável limitante, pela dificuldade em discutir com estudos que abrangem dada população especifica de um determinado país, porém, para minimamente levar em consideração esta variável em nossas análises, incluímos a variável “raça” nas nossas análises de regressão linear e logística multivariada como um possível fator de correção para essa limitação. Outra limitação importante encontrada para este estudo foi a difícil comparação com outros estudos devido a presença dos dois gêneros (masculino e feminino), diferente ao nosso que é especifico para a população masculina. Por fim, há uma grande escassez na literatura de estudos que

busquem por investigar as associações dos genes deste estudo (*PIK3CA* e *PIK3CG*) com a DE e seu desenvolvimento, apesar de sua importância destacada.

Por outro lado, citamos como fortalezas do presente estudo, os pacientes deste apresentarem DE de origem clínica, onde a discussão no âmbito de eventos cardiovasculares fica mais robusta e mais confiável sobre os mecanismos que envolvem essa associação, além de ser o primeiro estudo a associar variações genéticas do gene *PIK3CA* e *PIK3CG* com risco para o desenvolvimento de DE e níveis plasmáticos de nitrito, avaliando o envolvimento destes genes nos fenótipos presentes na DE. Porém, ainda há muito que se explorar nessa área, principalmente de que forma a responsividade dos tratamentos para DE estão resultando diante das variações genéticas, especificamente nestes genes (*PIK3CA* e *PIK3CG*).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, concluímos que polimorfismos genéticos no gene *PIK3CA* (rs6443624 e rs9838411) estão associados a função erétil, enquanto polimorfismos genéticos no gene *PIK3CG* (rs17398575 e rs1129293) estão associados aos níveis plasmáticos de nitrito. Com isso, sugerimos estudos futuros para um melhor entendimento de como possíveis fármacos que atuam como inibição ou ativação destes genes podem diferenciar em suas responsividades devido as variações genéticas.

7. REFERÊNCIAS

1 FISHER, J. S. et al. Sexual Health in the Elderly Population. **Curr Sex Health Rep,** v. 12, n. 4, p. 381-388, Dec 2020. ISSN 1548-3584. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33437223 >.

2 NI LOCHLAINN, M.; KENNY, R. A. Sexual activity and aging. **J Am Med Dir Assoc,** v. 14, n. 8, p. 565-72, Aug 2013. ISSN 1538-9375. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23540950 >.

3 SELVIN, E.; BURNETT, A. L.; PLATZ, E. A. Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US. **Am J Med,** v. 120, n. 2, p. 151-7, Feb 2007. ISSN 1555-7162. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275456 >.

4 JOHANNES, C. B. et al. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **J Urol,** v. 163, n. 2, p. 460-3, Feb 2000. ISSN 0022-5347. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647654 >.

5 CAPOGROSSO, P. et al. One patient out of four with newly diagnosed erectile dysfunction is a young man--worrisome picture from the everyday clinical practice. **J Sex Med,** v. 10, n. 7, p. 1833-41, Jul 2013. ISSN 1743-6109. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23651423 >.

6 DÜSING, R. Sexual dysfunction in male patients with hypertension: influence of antihypertensive drugs. **Drugs,** v. 65, n. 6, p. 773-86, 2005. ISSN 0012-6667. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15819590 >.

7 RAHEEM, O. A. et al. The Association of Erectile Dysfunction and Cardiovascular Disease: A Systematic Critical Review. **Am J Mens Health,** v. 11, n. 3, p. 552-563, 05 2017. ISSN 1557-9891. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26846406 >.

[8] GOLDSTEIN, I. et al. Epidemiology Update of Erectile Dysfunction in Eight Countries with High Burden. **Sex Med Rev,** v. 8, n. 1, p. 48-58, 01 2020. ISSN 2050-0521. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31416758 >.

[9] MCVARY, K. T. Clinical practice. Erectile dysfunction. **N Engl J Med,** v. 357, n. 24, p. 2472-81, Dec 13 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077811 >.

[10] JACKSON, G. Treatment of erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease : guide to drug selection. **Drugs,** v. 64, n. 14, p. 1533-45, 2004.

[11] RAJASEKARAN, M. et al. Altered growth factor expression in the aging penis: the Brown-Norway rat model. **J Androl,** v. 23, n. 3, p. 393-9, 2002 May-Jun 2002. ISSN 0196-3635. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12002441 >.

[12] MCANINCH, J. W.; LUE, T. F. **Smith & Tanagho's general urology**. Nineteenth. New York : McGraw-Hill Education, [2020], ISBN 1259834336 paperback
9781259834332 paperback.

[13] GONZÁLES, A. I. et al. Validation of the International Index of Erectile Function (IIFE) for use in Brazil. **Arq Bras Cardiol,** v. 101, n. 2, p. 176-82, Aug 2013. ISSN 1678-4170. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842798 >.

[14] CAPPELLERI, J. C. et al. Diagnostic evaluation of the erectile function domain of the International Index of Erectile Function. **Urology,** v. 54, n. 2, p. 346-51, Aug 1999. ISSN 1527-9995. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10443736 >.

[15] 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, Dec 01 2017. ISSN 1089-8611. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29074293 >.

16 GIULIANO, F. et al. Safety of sildenafil citrate: review of 67 double-blind placebo-controlled trials and the postmarketing safety database. **Int J Clin Pract,** v. 64, n. 2, p. 240-55, Jan 2010. ISSN 1742-1241. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900167 >.

17 SMITH, W. B. et al. PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence. **Int J Clin Pract,** v. 67, n. 8, p. 768-80, Aug 2013. ISSN 1742-1241. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869678 >.

18 SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. **Lancet,** v. 381, n. 9861, p. 153-65, Jan 12 2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23040455 >.

19 DA COSTA GONÇALVES, A. C. et al. Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol,** v. 293, n. 4, p. H2588-96, Oct 2007. ISSN 0363-6135. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616753 >.

20 HORASANLI, K. et al. Do lifestyle changes work for improving erectile dysfunction? **Asian J Androl,** v. 10, n. 1, p. 28-35, Jan 2008. ISSN 1008-682X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18087641 >.

21 GRATZKE, C. et al. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Sex Med,** v. 7, n. 1 Pt 2, p. 445-75, Jan 2010. ISSN 1743-6109. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092448 >.

22 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, Nov 2007. ISSN 1464-4096. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868426 >.

[23] HURT, K. J. et al. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 99, n. 6, p. 4061-6, Mar 19 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904450 >.

[24] LI, R. et al. Metabolic syndrome in rats is associated with erectile dysfunction by impairing PI3K/Akt/eNOS activity. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 13464, 10 18 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29044143 >.

[25] BERETTA, M.; BAUER, M.; HIRSCH, E. PI3K signaling in the pathogenesis of obesity: The cause and the cure. **Adv Biol Regul,** v. 58, p. 1-15, May 2015. ISSN 2212-4934. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512233 >.

[26] CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science,** v. 296, n. 5573, p. 1655-7, May 31 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040186 >.

[27] 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 Pt 3, p. 584-99, Jan 10 2016. ISSN 1879-0038. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26428312 >.

[28] DIMMELER, S. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature,** v. 399, n. 6736, p. 601-5, Jun 10 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10376603 >.

[29] HURT, K. J. et al. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 109, n. 41, p. 16624-9, Oct 09 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012472 >.

30 GINGERICH, S.; KRUKOFF, T. L. Activation of ERbeta increases levels of phosphorylated nNOS and NO production through a Src/PI3K/Akt-dependent pathway in hypothalamic neurons. **Neuropharmacology,** v. 55, n. 5, p. 878-85, Oct 2008. ISSN 0028-3908. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652836 >.

31 WEN, J. et al. A2B adenosine receptor contributes to penile erection via PI3K/AKT signaling cascade-mediated eNOS activation. **FASEB J,** v. 25, n. 8, p. 2823-30, Aug 2011. ISSN 1530-6860. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566208 >.

32 HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 6, n. 2, p. 150-66, Feb 2005. ISSN 1471-0072. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688001 >.

33 CONTRERAS, C. et al. Insulin resistance in penile arteries from a rat model of metabolic syndrome. **Br J Pharmacol,** v. 161, n. 2, p. 350-64, Sep 2010. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20735420 >.

34 GHIGO, A. et al. Specific PI3K isoform modulation in heart failure: lessons from transgenic mice. **Curr Heart Fail Rep,** v. 8, n. 3, p. 168-75, Sep 2011. ISSN 1546-9549. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519914 >.

35 FOUGERAT, A. et al. Key role of PI3Kγ in monocyte chemotactic protein-1-mediated amplification of PDGF-induced aortic smooth muscle cell migration. **Br J Pharmacol,** v. 166, n. 5, p. 1643-53, Jul 2012. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251152 >.

36 GHIGO, A. et al. Therapeutic applications of PI3K inhibitors in cardiovascular diseases. **Future Med Chem,** v. 5, n. 4, p. 479-92, Mar 2013. ISSN 1756-8927. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23495693 >.

[37] EL ASSAR, M. et al. FM19G11 reverses endothelial dysfunction in rat and human arteries through stimulation of the PI3K/Akt/eNOS pathway, independently of mTOR/HIF-1α activation. **Br J Pharmacol,** v. 172, n. 5, p. 1277-91, Mar 2015. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25363469 >.

[38] WYMANN, M. P.; MARONE, R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. **Curr Opin Cell Biol,** v. 17, n. 2, p. 141-9, Apr 2005. ISSN 0955-0674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780590 >.

[39] CARPENTER, C. L. et al. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. **J Biol Chem,** v. 265, n. 32, p. 19704-11, Nov 15 1990. ISSN 0021-9258. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2174051 >.

[40] WYMANN, M. P.; ZVELEBIL, M.; LAFFARGUE, M. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? **Trends Pharmacol Sci,** v. 24, n. 7, p. 366-76, Jul 2003. ISSN 0165-6147. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871670 >.

[41] LU, Y. et al. Phosphatidylinositol-3-kinase/akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production. **Am J Respir Cell Mol Biol,** v. 42, n. 4, p. 432-41, Apr 2010. ISSN 1535-4989. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520917 >.

[42] SAMUELS, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science,** v. 304, n. 5670, p. 554, Apr 23 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016963 >.

[43] YATES, L. R. et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. **Nat Med,** v. 21, n. 7, p. 751-9, Jul 2015. ISSN 1546-170X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26099045 >.

44 PARSAFAR, S. et al. Polymorphic GT dinucleotide repeat in the PIK3CA gene and risk of colorectal cancer. **Cancer Biomark,** v. 15, n. 4, p. 397-403, 2015. ISSN 1875-8592. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25835181 >.

45 ZHANG, L. et al. Genomic analyses reveal mutational signatures and frequently altered genes in esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Hum Genet,** v. 96, n. 4, p. 597-611, Apr 02 2015. ISSN 1537-6605. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25839328 >.

46 DE MATTIA, E.; CECCHIN, E.; TOFFOLI, G. Pharmacogenomics of intrinsic and acquired pharmacoresistance in colorectal cancer: Toward targeted personalized therapy. **Drug Resist Updat,** v. 20, p. 39-70, May 2015. ISSN 1532-2084. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26027741 >.

47 LIU, P. et al. Intravenous catheter-guided laser ablation: a novel alternative for branch varicose veins. **Int Surg,** v. 96, n. 4, p. 331-6, 2011 Oct-Dec 2011. ISSN 0020-8868. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22808616 >.

48 VECCHIONE, C. et al. Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma. **J Exp Med,** v. 201, n. 8, p. 1217-28, Apr 18 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824082 >.

49 CRACKOWER, M. A. et al. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. **Cell,** v. 110, n. 6, p. 737-49, Sep 20 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297047 >.

50 PATRUCCO, E. et al. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. **Cell,** v. 118, n. 3, p. 375-87, Aug 06 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294162 >.

51 OUDIT, G. Y. et al. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. **J Mol Cell Cardiol,** v. 37, n. 2, p. 449-71, Aug 2004. ISSN 0022-2828. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15276015 >.

52 MUNIZ, J. J. et al. Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. **Pharmacogenomics J,** v. 13, n. 2, p. 189-96, Apr 2013. ISSN 1473-1150. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064666 >.

53 LACCHINI, R. et al. VEGF genetic polymorphisms affect the responsiveness to sildenafil in clinical and postoperative erectile dysfunction. **Pharmacogenomics J,** v. 13, n. 5, p. 437-42, Oct 2013. ISSN 1473-1150. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007311 >.

54 HILDEBRANDT, M. A. et al. Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway are associated with clinical outcomes in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy. **J Clin Oncol,** v. 27, n. 6, p. 857-71, Feb 20 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164214 >.

55 WANG, L. E. et al. Roles of genetic variants in the PI3K and RAS/RAF pathways in susceptibility to endometrial cancer and clinical outcomes. **J Cancer Res Clin Oncol,** v. 138, n. 3, p. 377-85, Mar 2012. ISSN 1432-1335. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22146979 >.

56 BIZHANI, F. et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the PI3K/AKT/mTOR pathway and bladder cancer risk in a sample of Iranian population. **EXCLI J,** v. 17, p. 3-13, 2018. ISSN 1611-2156. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29383014 >.

57 LI, Q. et al. Associations between single-nucleotide polymorphisms in the PI3K-PTEN-AKT-mTOR pathway and increased risk of brain metastasis in

patients with non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res,** v. 19, n. 22, p. 6252-60, Nov 15 2013. ISSN 1557-3265. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077347 >.

58 APPELBOOM, G. et al. Variation in a locus linked to platelet aggregation phenotype predicts intraparenchymal hemorrhagic volume. **Neurol Res,** v. 34, n. 3, p. 232-7, Apr 2012. ISSN 1743-1328. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449554 >.

59 ADAMS, J. N. et al. Analysis of common and coding variants with cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. **Cardiovasc Diabetol,** v. 13, p. 77, Apr 12 2014. ISSN 1475-2840. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24725463 >.

60 LI, K. C.; YU, S. H.; ZHUGE, B. Z. PIK3CG single nucleotide polymorphisms are associated with poor responsiveness to clopidogrel and increased risk of ischemia in patients with coronary heart disease. **Medicine (Baltimore),** v. 96, n. 36, p. e7566, Sep 2017. ISSN 1536-5964. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28885323 >.

61 GU, X. et al. Association of PIK3CG gene polymorphisms with attention-deficit/hyperactivity disorder: A case-control study. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,** v. 81, p. 169-177, Feb 02 2018. ISSN 1878-4216. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097255 >.

62 KÄCHELE, M. et al. Variation in the Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Gene Affects Plasma HDL-Cholesterol without Modification of Metabolic or Inflammatory Markers. **PLoS One,** v. 10, n. 12, p. e0144494, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26658747 >.

63 KNOWLES, M. A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. **Cancer Metastasis Rev,** v. 28, n. 3-4, p. 305-16,

Dec 2009. ISSN 1573-7233. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013032 >.

64 PLATT, F. M. et al. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. **Clin Cancer Res,** v. 15, n. 19, p. 6008-17, Oct 01 2009. ISSN 1557-3265. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789314 >.

65 PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Front Oncol,** v. 4, p. 64, 2014. ISSN 2234-943X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782981 >.

66 HOUÉDÉ, N.; POURQUIER, P. Targeting the genetic alterations of the PI3K-AKT-mTOR pathway: its potential use in the treatment of bladder cancers. **Pharmacol Ther,** v. 145, p. 1-18, Jan 2015. ISSN 1879-016X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929024 >.

67 TAN, J. et al. Genetic variants in the inositol phosphate metabolism pathway and risk of different types of cancer. **Sci Rep,** v. 5, p. 8473, Feb 16 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25683757 >.

68 YUGE, K. et al. Nicotine Induces Tumor Growth and Chemoresistance through Activation of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Bladder Cancer. **Mol Cancer Ther,** v. 14, n. 9, p. 2112-20, Sep 2015. ISSN 1538-8514. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26184482 >.

69 GUERRERO-ZOTANO, A.; MAYER, I. A.; ARTEAGA, C. L. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. **Cancer Metastasis Rev,** v. 35, n. 4, p. 515-524, 12 2016. ISSN 1573-7233. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27896521 >.

70 PANG, B. et al. A single nucleotide polymorphism in PIK3CA gene is inversely associated with P53 protein expression in breast cancer. **Med**

Oncol, v. 31, n. 7, p. 30, Jul 2014. ISSN 1559-131X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24908061 >.

71 WALTER, V. et al. Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes. **PLoS One,** v. 8, n. 2, p. e56823, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23451093 >.

72 NORTHCOTT, C. A. et al. Phosphoinositide 3-kinase mediates enhanced spontaneous and agonist-induced contraction in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Circ Res,** v. 91, n. 4, p. 360-9, Aug 23 2002. ISSN 1524-4571. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193470 >.

73 WEHRWEIN, E. A. et al. Rho/Rho kinase and phosphoinositide 3-kinase are parallel pathways in the development of spontaneous arterial tone in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 309, n. 3, p. 1011-9, Jun 2004. ISSN 0022-3565. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982964 >.

74 DAVIES, S. P. et al. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochem J,** v. 351, n. Pt 1, p. 95-105, Oct 01 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998351 >.

75 SHIOI, T. et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. **EMBO J,** v. 19, n. 11, p. 2537-48, Jun 01 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835352 >.

76 PARMAR, S. et al. Pharmacogenetic predictors for EGFR-inhibitor-associated skin toxicity. **Pharmacogenomics J,** v. 13, n. 2, p. 181-8, Apr 2013. ISSN 1473-1150. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158333 >.

77 LI, H. G. et al. PIK3CA polymorphisms associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol,** v. 8, n. 11, p. 15255-9, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26823876 >.

78 BODNAR, L. et al. Clinical usefulness of PI3K/Akt/mTOR genotyping in companion with other clinical variables in metastatic renal cell carcinoma patients treated with everolimus in the second and subsequent lines. **Ann Oncol,** v. 26, n. 7, p. 1385-9, Jul 2015. ISSN 1569-8041. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25962440 >.

79 BRITES-ANSELMI, G. et al. DDAH1 and DDAH2 polymorphisms associate with asymmetrical dimethylarginine plasma levels in erectile dysfunction patients but not in healthy controls. **Nitric Oxide,** v. 92, p. 11-17, 11 01 2019. ISSN 1089-8611. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31394201 >.

80 OHASHI, Y. et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. **J Clin Invest,** v. 102, n. 12, p. 2061-71, Dec 15 1998. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9854041 >.

81 VAN GREEVENBROEK, M. M.; SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. **Neth J Med,** v. 71, n. 4, p. 174-87, May 2013. ISSN 1872-9061. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23723111 >.

82 LAFFARGUE, M. et al. Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. **Immunity,** v. 16, n. 3, p. 441-51, Mar 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911828 >.

83 DEL PRETE, A. et al. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. **EMBO J,** v. 23, n. 17, p.

3505-15, Sep 01 2004. ISSN 0261-4189. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15318168 >.

84 HIRSCH, E. et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. **Science,** v. 287, n. 5455, p. 1049-53, Feb 11 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669418 >.

85 EISENREICH, A.; RAUCH, U. PI3K inhibitors in cardiovascular disease. **Cardiovasc Ther,** v. 29, n. 1, p. 29-36, Feb 2011. ISSN 1755-5922. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20626398 >.

86 WOULFE, D. S. Akt signaling in platelets and thrombosis. **Expert Rev Hematol,** v. 3, n. 1, p. 81-91, Feb 2010. ISSN 1747-4094. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20352060 >.

87 O'NEILL, B. T. et al. A conserved role for phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt signaling in mitochondrial adaptations that accompany physiological cardiac hypertrophy. **Cell Metab,** v. 6, n. 4, p. 294-306, Oct 2007. ISSN 1550-4131. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908558 >.

88 SAWCZUK, M. et al. Association between single nucleotide polymorphism rs342286 near the PIK3CG gene and acute coronary syndromes. **Pol Arch Med Wewn,** v. 124, n. 4, p. 210-2, 2014. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556817 >.

89 HEMERICH, D. et al. Impact of carotid atherosclerosis loci on cardiovascular events. **Atherosclerosis,** v. 243, n. 2, p. 466-8, Dec 2015. ISSN 1879-1484. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26520901 >.

90 ROHATGI, A. et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. **N Engl J Med,** v. 371, n. 25, p. 2383-93, Dec 18 2014. ISSN 1533-4406. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404125 >.

ANEXO A

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO - USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: Riccardo Lacchini
Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);
Versão: 3
CAAE: 51408515.9.0000.5393
Instituição Proponente: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.470.518

Apresentação do Projeto:
Trata-se de EMENDA ao Projeto que, originariamente, pretendia investigar as bases genéticas da disfunção erétil, conforme descrito em Parecer anterior deste CEP. Originariamente, eram recrutados 1000 sujeitos, sendo 500 no ambulatório de Urologia do HC de Ribeirão Preto e outros 500, como grupo de Controle, na População de Ribeirão Preto. Pretendia-se coletar amostra de sangue de cada um dos sujeitos para análises genéticas e bioquímicas.
A Emenda, conforme descrito no item 7 da mais recente versão do Projeto, é para que sejam incluídas também amostras PREVIAMENTE COLETADAS de pacientes, originários de outro estudo. Trata-se do Projeto "Farmacogenética do Tratamento de Controles", aprovado pelo CEP do HCFMRP (ofício 2244 do ano de 2008). Tal projeto era de responsabilidade do Prof. Dr. José Tanus do Santos, que então é, neste projeto atual, incluído como colaborador. Naquele Projeto do ano de 2008 houve, como ora mostra o pesquisador, a coleta de amostras entre os anos de 2009 e 2012, também em 500 pacientes e em 500 membros da população, como controle.
A proposta de emenda, portanto, restringe-se ao uso dessas amostras já coletadas, para oferecer "um poder amostral razoável para nos permitir investigar polimorfismos mais raros".

Endereço: BANDEIRANTES 3900
Bairro: VILA MONTE ALEGRE **CEP:** 14.040-902
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-3386 **E-mail:** cep@eerp.usp.br

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Seguem os mesmos do parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer apreciado "ad referendum".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_676896E1.pdf	09/03/2016 11:05:45		Aceito
Outros	TCLEdoprojetoantigodaFMRP.doc	09/03/2016 11:05:08	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	EMENDApedidoaocepedispensaTCLE.	09/03/2016	Riccardo Lacchini	Aceito

Endereço: BANDEIRANTES 3900
Bairro: VILA MONTE ALEGRE **CEP:** 14.040-902
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-3386 **E-mail:** cep@eerp.usp.br

Outros	pdf	11:01:50	Riccardo Lacchini	Aceito
Declaração de Pesquisadores	autorizacaodeusodeamostraspelopesquisador.pdf	09/03/2016 11:00:53	Riccardo Lacchini	Aceito
Declaração de Pesquisadores	pedidoparausodeamostrasaopesquisador.pdf	09/03/2016 10:59:56	Riccardo Lacchini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodisfuncaoeretileerp2015v4emendqa.pdf	09/03/2016 10:59:05	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	cartaderespostaaoCEP.pdf	04/01/2016 14:43:18	Riccardo Lacchini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLErev2.pdf	04/01/2016 14:41:43	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	autorizacaocoletashcfmrp.pdf	30/11/2015 09:25:13	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	justificativanecessidadeutilizacaofutura.pdf	29/11/2015 08:56:54	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	declsubmissaoestudosfuturos.pdf	29/11/2015 08:55:50	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	ORcAMENTO2.pdf	29/11/2015 08:53:58	Riccardo Lacchini	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoprgrandeassinada.pdf	23/11/2015 11:18:47	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	percepcaostress.pdf	29/10/2015 16:51:02	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	IEEF.doc	29/10/2015 16:49:48	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	YlmarCorreaNetoAnexoII.pdf	29/10/2015 16:41:31	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	SaudeMentaltracking0703.pdf	29/10/2015 16:41:10	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	EscalaBECKdeIdeacaoSuicida.pdf	29/10/2015 16:40:43	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	EscalaBECKdeDesesperanca.pdf	29/10/2015 16:39:20	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	entrevistaSCID.pdf	29/10/2015 16:37:28	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	ChildhoodTraumaQuestionnaire.docx	29/10/2015 16:37:16	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	Beckdepressao.doc	29/10/2015 16:37:04	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	BEckansiedade.doc	29/10/2015 16:36:51	Riccardo Lacchini	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAv1.pdf	29/10/2015 16:34:03	Riccardo Lacchini	Aceito
Outros	EncaminhamentoCEPRiccardo.pdf	29/10/2015	Riccardo Lacchini	Aceito

Endereço: BANDEIRANTES 3900
Bairro: VILA MONTE ALEGRE **CEP:** 14.040-902
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-3386 **E-mail:** cep@eerp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.470.518

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

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 30 de Março de 2016

Assinado por:
Claudia Benedita dos Santos
(Coordenador)

Endereço: BANDEIRANTES 3900
Bairro: VILA MONTE ALEGRE **CEP:** 14.040-902
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-3386 **E-mail:** cep@eerp.usp.br

ANEXO B

USP - ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO DA USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação dos polimorfismos do gene PI3K com a disfunção erétil e resposta ao Sildenafil

Pesquisador: Leticia Perticarrara Ferezin

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

Versão: 3

CAAE: 34945120.1.0000.5391

Instituição Proponente: Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.952.943

Apresentação do Projeto:

Trata-se da análise da resposta à pendência emitida em parecer número 4.900.892.

Objetivo da Pesquisa:

Sem alterações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem alterações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi anexado ofício de encaminhamento e projeto de pesquisa.

Recomendações:

O CEP-EERP/USP considera que o protocolo de pesquisa ora apresentado contempla os quesitos éticos necessários, estando apto a ser iniciado a partir da presente data de emissão deste parecer.

Em atendimento ao subitem II.19 da Resolução CNS 466/2012, cabe ao pesquisador responsável

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

pelo presente estudo elaborar e apresentar relatórios parcial e final "[...] após o encerramento da pesquisa, totalizando seus resultados", em forma de "notificação". O modelo de relatório do CEP-EERP/USP se encontra disponível em:
http://www.eerp.usp.br/research-comite-etica-pesquisa-relatorio/

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência 1: Solicita-se que a pesquisadora harmonize as informações referentes à coleta de dados que constam no resumo e no método do arquivo Projeto.pdf.

Resposta da pesquisadora: As informações do resumo foram harmonizadas com as informações do item “Materiais e métodos” do arquivo “Projeto.pdf”, estas alterações estão grifadas em amarelo no arquivo “Projeto.pdf” no item “Resumo”.

Pendência ATENDIDA.

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer apreciado ad referendum.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1294662.pdf	16/08/2021 16:38:16		Aceito
Outros	Oficioresppendparecer.pdf	16/08/2021 16:37:42	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	16/08/2021 15:23:21	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	12/08/2021 21:52:27	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostonova.pdf	02/06/2021 00:13:02	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JustificativaDispensaTCLE.pdf	08/07/2020 09:15:30	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito

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

Outros	Oficiodeencaminhamentoaocep.pdf	24/06/2020 13:14:42	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito
Outros	TCLE_Projeto_Maior_Disfuncao_Eretil.pdf	24/06/2020 12:59:51	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito
Outros	Projeto_Maior_Disfuncao_Eretil.pdf	24/06/2020 12:58:37	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito
Outros	Parecer_consubstanciado_Cep_Projeto_Maior.pdf	24/06/2020 12:58:02	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Autorizacao_de_uso_de_amostras_biorrepositorio.pdf	24/06/2020 12:53:27	Leticia Perticarrara Ferezin	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 03 de Setembro de 2021

Assinado por:
Rosane Pilot Pessa
(Coordenador(a))

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

ANEXO C

Índice Internacional de Função Erétil (IIEF)

Nome:_____
Registo:_____

O Índice Internacional de Função Eréctil (IIEF) permite realizar um diagnóstico preditivo da Disfunção Eréctil com base na pontuação das respostas a quinze questões sobre os efeitos que problemas eréteis tenham tido sobre a sua atividade sexual nas últimas 4 semanas.
Tenha em consideração que quanto mais próxima da sua realidade e mais verdadeira forem as respostas, melhor será o resultado do diagnóstico preditivo e melhores serão as orientações iniciais do seu caso específico. Por favor, preencha com uma cruz a resposta que mais se adequa a cada uma das questões. As seguintes definições aplicam-se às questões colocadas:
- ereção define-se como o aumento e endurecimento do pénis
- estimulação sexual inclui situações como preliminares sexuais, imagens eróticas, etc.
- penetração define-se como o ato de introdução do pénis na vagina, ânus, boca, etc.
- relações sexuais definem-se como penetração sexual da(o) sua(seu) parceira(o)
- atividade sexual inclui penetração, carícias, preliminares e masturbação.

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 ultimas 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 ultimas 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 ultimas 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 ultimas quatro semanas, quantas vezes você tentou ter relação	( ) Não tentou ( ) 1-2 tentativas

sexual?	( ) 3-4 tentativas ( ) 5-6 tentativas ( ) 7-10 tentativas ( ) 11 ou mais tentativas
7. Nas ultimas 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 ultimas 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 ultimas 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 ultimas 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 ultimas 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 ultimas quatro semanas, o quanto você consideraria o seu nível de desejo sexual?	( ) Muito alto ( ) Alto ( ) Moderado ( ) Baixo ( ) Muito baixo ou inexistente
13. Nas ultimas quatro semanas, de modo geral, o quão satisfeito você tem estado com sua vida sexual?	( ) Muito satisfeito ( ) Moderadamente satisfeito ( ) Igualmente satisfeito ou insatisfeito ( ) Moderadamente insatisfeito ( ) Muito insatisfeito
14. Nas ultimas quatro semanas, de modo geral, o quão satisfeito você tem estado com o seu relacionamento sexual com sua parceira ou parceiro?	( ) Muito satisfeito ( ) Moderadamente satisfeito ( ) Igualmente satisfeito ou insatisfeito ( ) Moderadamente insatisfeito ( ) Muito insatisfeito

15. Nas ultimas quatro semanas, como você consideraria a sua confiança em conseguir ter e manter uma ereção?	( ) Muito alta ( ) Alta ( ) Moderada ( ) Baixa ( ) Muito baixa