



JAQUELINE JÓICE MUNIZ

**“RESPOSTA AO SILDENAFIL EM PACIENTES COM
DISFUNÇÃO ERÉTIL: ESTUDO DE MARCADORES
GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO
ÓXIDO NÍTRICO”**

***“RESPONSE TO SILDENAFIL IN PATIENTS WITH
ERECTILE DYSFUNCTION: STUDY OF GENETIC
AND BIOCHEMICAL MARKERS RELATED TO
NITRIC OXIDE”***

CAMPINAS

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

JAQUELINE JÓICE MUNIZ

**“RESPOSTA AO SILDENAFIL EM PACIENTES COM DISFUNÇÃO
ERÉTIL: ESTUDO DE MARCADORES GENÉTICOS E
BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO ÓXIDO NÍTRICO”**

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

***“RESPONSE TO SILDENAFIL IN PATIENTS WITH ERECTILE
DYSFUNCTION: STUDY OF GENETIC AND BIOCHEMICAL
MARKERS RELATED TO NITRIC OXIDE”***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutora em Farmacologia.

Doctorate thesis presented to the Pharmacology Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D grade in Pharmacology.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JAQUELINE JÓICE MUNIZ E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M925r Muniz, Jaqueline Jóice, 1985-
Resposta ao Sildenafil em pacientes com disfunção
erétil : estudo de marcadores genéticos e bioquímicos
relacionados ao óxido nítrico / Jaqueline Jóice Muniz. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : José Eduardo Tanus dos Santos.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Disfunção erétil. 2. Óxido nítrico. 3. Estresse
oxidativo. 4. Sildenafil. 5. Farmacogenética. I. Santos,
José Eduardo Tanus dos. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Response to Sildenafil in patients with erectile dysfunction : study of genetic and biochemical markers related to nitric oxide.

Palavras-chave em inglês:

Erectile dysfunction

Nitric oxide

Oxidative stress

Sildenafil

Pharmacogenetics

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

José Eduardo Tanus dos Santos [Orientador]

Fabiola Taufic Monica Iglesias

Adriano Fregonesi

Ester Silveira Ramos

Maria Andréia Delbin

Data da defesa: 30/07/2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

JAQUELINE JÓICE MUNIZ

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Membros:

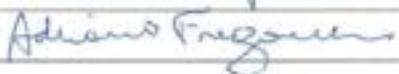
Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos



Prof. Dr. Fabiola Taufic Monica Iglesias



Prof. Dr. Adriano Fregonesi



Profa. Dra. Ester Silveira Ramos



Profa. Dra. Maria Andréia Delbin



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/07/2012

DEDICATÓRIA

*A minha mãe, Guiomar,
meus irmãos e meus
sobrinhos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar, ser minha fonte de apoio, fé e perseverança.

A minha grande família: a minha mãe, Guiomar, por todo amor, paciência, carinho e confiança depositados em mim; ao meu pai, José, que mesmo não mais presente olha e torce por mim em todos os momentos de minha vida; aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, pelo carinho e por entenderem minha ausência em momentos tão especiais.

Ao professor José Eduardo, pela orientação e incentivo para a realização deste trabalho e por possibilitar o meu início na ciência.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia Cardiovascular agradeço pelos memoráveis momentos que com certeza deixarão saudades. Em especial a Vanessa e Valzinha, que se mantiveram sempre presentes e se transformaram em amizades pra vida toda.

A técnica e amiga Sandra, pela prestabilidade e apoio na realização deste estudo.

Agradeço as minhas eternas amigas, Tânia, Aline, Joyce e Chiara, cuja amizade atravessa os tempos.

Ao Evandro, pelo companheirismo e apoio no dia a dia.

Ao Riccardo Lacchini e Tiago Rinaldi, pela colaboração nos estudos.

Agradeço aos médicos colaboradores: Dr. Martins, Yuri, Silvio e Adauto, por possibilitarem a realização deste trabalho.

Ao professor Alceu Jordão e as técnicas Liliam Eslaine e Paula Payão pela colaboração nos experimentos.

Agradeço aos funcionários do ambulatório de urologia e UTR do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Em especial a querida Marta, pela inestimável colaboração na coleta de sangue dos participantes desse estudo e pela disponibilidade e dedicação para a realização do mesmo.

Agradeço ao secretário do programa de Farmacologia da Unicamp, Bruno Alves, por todo apoio para a realização dos exames de qualificação e defesa.

Aos voluntários desse trabalho pela contribuição fundamental a esse estudo e ao progresso da ciência.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela contribuição no presente trabalho

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro a este trabalho

*“Sê humilde para evitar o orgulho,
mas voa alto para alcançar a
sabedoria”*

(Santo Agostinho)

RESUMO

A disfunção erétil (DE) é uma doença que atinge milhões de homens em todo o mundo e tem sua prevalência aumentada com a idade. O tratamento via oral mais utilizado para pacientes com DE é o sildenafil, um inibidor de fosfodiesterase do tipo 5, que age aumentando níveis de monofosfato cíclico de guanosina, melhorando assim a função erétil. O óxido nítrico (NO) é o principal responsável pela dilatação dos corpos cavernosos e consequente ereção peniana. Polimorfismos no gene da enzima sintase de NO endotelial (eNOS) foram mostrados estarem associados a formação de NO e suscetibilidade à DE. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se marcadores genéticos e bioquímicos poderiam afetar a resposta ao tratamento com sildenafil em pacientes com DE. Polimorfismos no gene da eNOS (*SNP* na região promotora, T⁻⁷⁸⁶C; *VNTR* no intron 4, 4b4a; *SNP* no exon 7, Glu298Asp), marcadores da formação de NO (nitrito no sangue total) e estresse oxidativo (glutathiona reduzida, FRAP, TBARS e proteínas carboniladas) foram utilizados para avaliar uma possível correlação com resposta terapêutica ao sildenafil em dois estudos. A função erétil de todos participantes foi avaliada utilizando o questionário Índice Internacional de Função Erétil (IIEF). No estudo de marcadores genéticos e resposta ao sildenafil foram selecionados 118 pacientes (63 pacientes com DE pós operatória e 55 pacientes com DE clínica) divididos em bons e maus respondedores ao sildenafil de acordo com a pontuação no IIEF. Foi observado neste estudo que a presença do alelo C para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C em pacientes com DE pós operatória, e do alelo 4a para o polimorfismo 4b4a em pacientes com DE clínica, foi mais frequente em bons respondedores comparado aos maus respondedores ao sildenafil. Além do mais, em pacientes com DE pós operatória, o haplótipo constituído pelos alelos C 4a Glu foi mais comum em bons respondedores comparados aos maus respondedores ao sildenafil. No estudo de marcadores bioquímicos e resposta ao sildenafil foram recrutados 44 pacientes e 28 homens saudáveis. Os 44 pacientes foram divididos em dois grupos: 26 pacientes com DE (grupo DE) e 18 pacientes com DE e diabetes mellitus do tipo II (grupo DE/DM). Os resultados do nosso estudo bioquímico sugerem que baixos níveis de NO em pacientes nos dois

grupos de DE clínica (grupo DE e grupo DE/DM) são benéficos em relação ao tratamento com sildenafil nesses pacientes. Além disso, baixo nível do marcador antioxidante FRAP mostrou ser melhor para resposta ao sildenafil em pacientes do grupo DE/DM. Em conclusão, nossos achados mostram que polimorfismos no gene da eNOS e marcadores da formação de NO e estresse oxidativo estão associados a resposta ao tratamento com sildenafil em pacientes com DE.

Palavras-chave: Disfunção erétil. Óxido nítrico. Estresse oxidativo. Sildenafil. Farmacogenética.

ABSTRACT

Erectile dysfunction (ED) affects millions of men around the world. Its prevalence increases with age. The most common treatment for patients with ED is sildenafil, an inhibitor of phosphodiesterase type 5, which acts by increasing levels of cyclic guanosine monophosphate, thereby improving erectile function. Nitric oxide (NO) is the mainly responsible for the corpus cavernosum dilatation, and consequent penile erection. Polymorphisms in the gene of the enzyme NO synthase (eNOS) have been shown to be associated with the formation of NO and susceptibility to DE. The objective of this study was to evaluate if genetic and biochemical markers could affect response to treatment with sildenafil in patients with ED. Polymorphisms in eNOS gene (SNP in the promoter region, T⁻⁷⁸⁶C; VNTR in the intron 4, 4b4a; SNP in the exon 7, Glu298Asp) and markers of NO formation (whole blood nitrite) and oxidative stress (reduced glutathione, FRAP, TBARS and carbonyl) were used to evaluate a possible association with therapeutic response to sildenafil in two studies. The erectile function of all participants was assessed using the IIEF questionnaire. In the study of genetic markers and response to sildenafil were selected 118 patients (63 patients with postoperative ED and 55 patients with clinic ED) divided into good and poor responders to sildenafil according to IIEF score. It was observed in that study that the C allele for the SNP T⁻⁷⁸⁶C in patients with postoperative ED, and the 4a allele for the VNTR 4b4a in patients with clinical ED were more common in good responders compared to poor responders to sildenafil. Moreover, in patients with postoperative ED, the haplotype consisting of C 4a Glu alleles was more common in good responders compared to poor responders to sildenafil. In the study of biochemical markers and response to sildenafil were recruited 44 patients and 28 healthy men. The 44 patients were divided into two groups: 26 patients with ED (ED group) and 18 patients with ED and type II diabetes mellitus (ED/DM group). The results of our biochemical study suggest that lows level of NO in patients in two clinical groups of DE (DE and ED/DM groups) are beneficial in the treatment with sildenafil in that patients. Moreover, low level of the antioxidant FRAP marker showed be better for sildenafil responsiveness in ED/DM group. In conclusion, our findings show that eNOS gene

polymorphisms and markers of NO formation and oxidative stress affect the response to treatment with sildenafil in patients with ED.

Keywords: Erectile dysfunction. Nitric oxide. Oxidative stress. Sildenafil. Pharmacogenetics.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BR	Bons Respondedores ao Sildenafil
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCV	Doença Cardiovascular
DE	Disfunção Erétil
DM	Diabetes Mellitus tipo II
eNOS	Sintase de Óxido Nítrico Endotelial
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET-1	Endotelina 1
FE	Função Erétil
FRAP	Potencial Antioxidante de Redução do Ferro
GMP	Guanosina Monofosfato
GMP_c	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GSH	Glutationa Reduzida
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
IIEF	Índice Internacional de Função Erétil

iNOS	Sintase de Óxido Nítrico Induzida
iPDE-5	Inibidor de Fosfodiesterase do tipo 5
MR	Maus Respondedores ao Sildenafil
NANC	Não Adrenérgica Não Colinérgica
nNOS	Sintase de Óxido Nítrico Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintase de Óxido Nítrico
PDE	Fosfodiesterase
PDE-5	Fosfodiesterase tipo 5
PKC	Proteína Quinase C
RPA-1	Proteína Repressora de Transcrição
SNP	Polimorfismo de Base Única
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
VNTR	Número Variável de Repetições em Tandem
ΔIIEF-5(%)	Delta Percentual do Quinto Domínio do IIEF

	Pag.
RESUMO	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
1- INTRODUÇÃO	17
1.1– Ereção Peniana e Óxido Nítrico.....	18
1.2– Disfunção Erétil.....	19
1.2.1 – Fatores de Risco para Disfunção Erétil.....	20
1.2.1.1-Estresse Oxidativo e Disfunção Erétil.....	21
1.2.1.2– Polimorfismos de eNOS na Disfunção Erétil.....	22
1.2.2– Tratamento da Disfunção Erétil.....	24
2- OBJETIVOS	26
3- CAPÍTULOS	28
3.1-Capítulo 1.....	29
3.2-Capítulo 2.....	38
4- DISCUSSÃO	55
5- CONCLUSÃO	70
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
7 – ANEXOS.....	81
7.1 – Resultados Suplementares.....	82
7.2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	87
7.3 – Questionário Índice Internacional de Função Erétil.....	88
7.4 – Declaração para Cópias de Artigos.....	90

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Ereção Peniana e Óxido Nítrico

A ereção peniana é considerada um fenômeno neurovascular que se inicia com estímulo neural e finaliza com eventos na vasculatura peniana. O pênis é formado fundamentalmente pela uretra, por um corpo esponjoso e por dois corpos cavernosos. O corpo esponjoso envolve a uretra desde o diafragma urogenital até a glândula, sendo esta a expansão do corpo esponjoso. O tecido erétil cavernoso é composto pelos sinusóides, que são múltiplos espaços lacunares interconectados e que tem em seu interior o epitélio vascular e em seu exterior as trabéculas compostas principalmente de tecido muscular liso. Os corpos cavernosos são circundados pela albugínea, que é composta principalmente por fibras de colágeno tipo I e elastina [1] O suprimento sanguíneo para o pênis é feito pelas artérias pudendas internas direita e esquerda, que se ramificam em artérias cavernosas, enquanto que a drenagem venosa é feita principalmente por três sistemas: o superficial que drena o sangue da pele e do subcutâneo, o intermediário e o profundo que drenam o sangue dos corpos cavernosos [1, 2].

A ereção peniana inicia-se quando o sistema nervoso central atua integrando estímulos psicogênicos, tais como desejo, estímulos visuais e táteis, e inervações simpáticas e parassimpáticas do pênis. Os primeiros eventos após o estímulo parassimpático são o relaxamento de artérias cavernosas, de seus ramos helicoidais e do músculo liso trabecular que envolve os sinusóides. Esses eventos de relaxamento levam a um aumento da complacência dos corpos cavernosos e aumento do fluxo sanguíneo no tecido cavernoso por impulso da força da pressão arterial. O relaxamento e expansão do tecido erétil levam a um aumento da pressão intracavernosa, compressão e estiramento das veias subtúnicas e emissárias contra a albugínea, que por ser menos complacente dificulta a saída de sangue do pênis, mecanismo esse chamado de veno-oclusão que leva à rigidez peniana [1, 2].

O óxido nítrico (NO), um gás envolvido em muitos processos biológicos, como relaxamento de músculo liso e controle de agregação plaquetária, é o

principal responsável pelo relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos [3]. É formado pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS): NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzida (iNOS), a partir do aminoácido L-arginina [3]. O NO é liberado inicialmente em nervos não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC) e células endoteliais. Uma vez liberado, o NO se difunde até a célula do músculo liso do tecido cavernoso, ativa a enzima guanilato ciclase solúvel aumentando a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c), que por sua vez leva a diminuição de cálcio intracelular, relaxamento das células do músculo liso, vasodilatação e conseqüente tumescência peniana [1, 2, 4]. O GMP_c diminui os níveis de íons cálcio intracelular por ativar a proteína quinase G (PKG). A PKG leva ao relaxamento do músculo liso ao bloquear os canais de cálcio, reduzindo então a entrada desse íon na célula e aumentando sua saída para o retículo sarcoplasmático, o que resulta no relaxamento do músculo liso cavernoso mediado por NO. O GMP_c é hidrolisado em GMP (guanosina monofosfato) por ação da fosfodiesterase 5 (PDE-5), promovendo a detumescência peniana [1].

Por outro lado, durante o estado de flacidez peniana, há o predomínio da atividade da inervação simpática, principalmente por ação de noradrenalina e também por endotelina-1 (ET-1) agindo em receptores ET-A [1, 5], o que leva a uma contração arteriolar, dificulta o afluxo sanguíneo e mantém baixa a pressão intracavernosa [1], mantendo assim o estado de flacidez peniana.

1.2 – Disfunção Erétil

Disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de se obter e/ou manter uma ereção peniana que permita uma relação sexual satisfatória [6]. É uma condição clínica que afeta milhões de homens no mundo todo e tem sua prevalência aumentada com a idade [7]. A DE é atribuível a duas principais causas: psicológicas e orgânicas, ou ainda pode ter como causa a associação entre essas. Entre as causas orgânicas, a DE de origem vascular é a mais comum, sendo responsável pela maioria dos casos [6, 8]. Atualmente a DE vem

sendo utilizada como um marcador para identificar doenças cardiovasculares (DCV) silenciosas [8, 9], como a doença arterial coronariana (DAC), visto que a incidência de DAC e de doença arterial periférica (DAP) é maior em homens que apresentam DE [10]. Além do mais, a DE compartilha muitos fatores de risco com DCV, tais como hipertensão, tabagismo, obesidade, dislipidemia, diabetes e alcoolismo, os quais têm como denominador comum a disfunção endotelial [10, 11]. Dentre esses fatores, em pacientes com diabetes melittus do tipo II (DM) a DE pode se manifestar até mesmo antes de outros sintomas da doença [12, 13]. Somado aos fatores acima mencionados, algumas classes de medicamentos prescritos rotineiramente (diuréticos, anti-hipertensivos, antidepressivos, hormônios entre outras) podem estar associadas com o surgimento da DE [6].

Além disso, sabendo-se que a ereção peniana é dependente da integridade anatômica e funcional dos componentes envolvidos nos eventos neurovasculares, fatores que afetam esses componentes podem contribuir também para a patogênese da DE. Durante a cirurgia de retirada da próstata, denominada prostatectomia radical, podem ocorrer lesões de nervos cavernosos, o que em muitos casos leva a DE de causa neurogênica [14]. Imagina-se que a lesão de nervos cavernosos cause um prejuízo na liberação de NO pelas fibras nervosas NANC, necessário para a ereção peniana [2, 14]. Sendo assim, a prostatectomia radical contribui para o número elevado de pacientes com DE.

1.2.1 – Fatores de risco para Disfunção Erétil

A maioria dos fatores de risco para DE tem em comum com essa doença a disfunção endotelial. Como já foi mencionado, o endotélio e o NO são de fundamental importância para o mecanismo de ereção peniana. Apesar da disfunção no endotélio ser multifatorial, hoje sabe-se que o estresse oxidativo tem uma grande contribuição para este fenômeno [15, 16].

Além do estresse oxidativo, outro fator que afeta a biodisponibilidade de NO [17-21] e tem uma associação com DE [22-30] são os polimorfismos no gene da eNOS.

1.2.1.1 – Estresse Oxidativo e Disfunção Erétil

O estresse oxidativo, classificado como o desequilíbrio entre espécies pró-oxidantes e antioxidantes [15], vem sendo mostrado estar associado à disfunção endotelial e conseqüentemente à DE [13, 31, 32]. Ocorre quando células são expostas a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são formadas durante o metabolismo regular, devido à redução univalente da molécula de oxigênio. As moléculas conhecidas como superóxido (O_2^-) são as mais importantes entre as EROs. Além dos superóxidos existem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido perclórico (HOCl) e os peroxinitritos ($OONO^-$), que são outros radicais importantes implicados na fisiopatologia de doenças vasculares [33]. O endotélio vascular é a principal fonte para EROs, juntamente com as plaquetas e leucócitos [13, 33].

O NO, além de seus diversos papés biológicos, é um espécie reativa de oxigênio, que em condições fisiopatológicas pode contribuir para o estresse oxidativo [33]. A interação entre NO e EROs é um importante mecanismo implicado no processo fisiopatológico da DE. O NO interage com o superóxido para formar peroxinitrito, que também causa um relaxamento do músculo liso, porém é bem menos potente que o relaxamento causado pelo NO, sendo ineficiente nos tecidos cavernosos e podendo levar à DE. Além disso, o superóxido também é capaz de reduzir a biodisponibilidade de NO [13, 33], maneira pela qual também pode contribuir para DE.

Em doenças como DM, o estresse oxidativo está exacerbado, sendo a causa de muitos dos sintomas dessa doença. O DM é considerado um fator de risco isolado para DE. Geralmente, o estresse oxidativo presente nessa doença leva a

uma piora da função endotelial e também causa neuropatia dos nervos cavernosos em homens diabéticos, sendo esta a possível causa da presença comum da DE em pacientes com DM [34].

1.2.1.2 – Polimorfismos de Óxido Nítrico Sintases e Disfunção Erétil

Polimorfismos no gene da NOS vem sendo bastante estudados e associados com DE [22-30], entre outras doenças vasculares [35-44]. Como já foi mencionado, dentre as três isoformas da NOS, a eNOS apresenta polimorfismos que foram associados com DE.

O gene da eNOS tem 21kb contendo 26 éxons e 25 íntrons e está localizado no cromossomo 7 na posição q35-36 (7q35-36) [43]. Os polimorfismos no gene da eNOS mais estudados são: SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) T⁻⁷⁸⁶C na região promotora; VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) 4b4a no intron 4; SNP Glu298Asp no exon 7. O SNP T⁻⁷⁸⁶C no promotor, leva a uma alteração de uma timina (T) por uma citosina (C) na posição 786. Já foi demonstrada a funcionalidade deste SNP *in vitro*, sendo que o alelo C leva a uma diminuição de aproximadamente 50% da atividade transcricional do gene, devido à criação de um sítio de ligação de uma proteína repressora de transcrição (RPA-1) à região promotora [45]. Já foi mostrado também que a presença do alelo C está relacionado a menores níveis de NO derivado de plaqueta [19], e também já foi visto que este alelo é mais frequente em pacientes com DE comparado a homens saudáveis [22, 23]

O polimorfismo do intron 4 da eNOS aparece como repetições de 27bp que ocorrem em número variável, adjacentes umas às outras. Existem dois alelos, alelo 4a e alelo 4b, que são encontrados com maior frequência nas populações. A

característica que difere estes alelos uns dos outros é a quantidade de repetições de 27pb, sendo que os indivíduos portadores do alelo 4a apresentam quatro repetições, enquanto que os indivíduos portadores do alelo 4b têm cinco destas repetições. Acredita-se que este polimorfismo atue na regulação da expressão da eNOS funcionando como repressor, podendo causar uma diminuição ou aumento da expressão do gene de acordo com o alelo presente. Apesar de não ter sido totalmente elucidada a maneira pela qual o polimorfismo do íntron 4 age na atividade e na transcrição da eNOS, estudos mostram que esse polimorfismo está possivelmente associado à formação de um pequeno RNA que interfere na expressão do gene da eNOS [46, 47]. Apesar de terem sido realizados vários estudos para avaliar a suscetibilidade de pacientes com estes polimorfismos à DE [22, 24, 28, 29, 48, 49], nenhum deles encontrou tal associação, somente Erkan e colaboradores (2006) notaram que indivíduos com DE e DM, mas não aqueles somente com DE, tinham uma maior frequência do alelo 4a [24]

O outro SNP bastante estudado na eNOS localiza-se no éxon 7, consiste na troca de uma guanina (G) por timina (T) na posição 894 do gene, levando a uma substituição de um aminoácido glutamato (Glu) por um aspartato (Asp) na posição 298 da proteína (Glu298Asp) [43]. Joshi e colaboradores (2007). verificaram que o variante Asp está associado a uma menor quantidade de eNOS contida em cavéolas da membrana plasmática, sustentando a hipótese de que menores conteúdos de eNOS nessas regiões da membrana resultam em atividade diminuída da enzima [50]. Além do mais, a presença do alelo Asp também foi associada a menor quantidade de NO plaquetário [19]. Em relação a DE, estudos em diferentes populações encontraram que a presença do alelo Asp leva a suscetibilidade a essa doença [22, 25-30].

Com base no conhecimento dos marcadores genéticos, a associação dos mesmos incluídos em um haplótipo parece ser uma ferramenta mais precisa na elucidação da susceptibilidade a doenças do que a análise de marcadores

genéticos analisados isoladamente. Assim, a associação de alguns haplótipos pode contribuir mais efetivamente para elucidar a susceptibilidade de desenvolver uma doença comparado a análise de marcadores analisados individualmente [51].

Não existe até o momento nenhum trabalho que associou polimorfismos da nNOS e da iNOS à DE. Apesar disso, alguns trabalhos relacionam polimorfismos dessas isoformas a outras doenças, entre elas algumas de origem vascular [35, 40].

1.2.2 – Tratamento da Disfunção Erétil

Até 1998 as únicas formas de tratamento da DE consistiam na aplicação intracavernosa ou intrauretral de prostaglandina E₁, bombas a vácuo ou prótese peniana [52]. A descoberta dos efeitos positivos do sildenafil em pacientes trouxe ao mercado a primeira opção segura e eficaz de tratamento por via oral, o citrato de sildenafil. Atualmente, entre todos os tratamentos para a DE, o menos invasivo e preferido entre os pacientes é o tratamento farmacológico por via oral [53].

O sildenafil pertence à classe das drogas inibidoras da fosfodiesterase tipo 5 (iPDE5), juntamente com o tadalafil, o vardenafil e o lodenafil, e tem uma afinidade maior à PDE-5 do que a outros tipos de PDE, como PDE-4 ou PDE-3, o que explica a sua ação no tratamento da DE, já que a PDE-5 é a mais presente no corpo cavernoso [1]. O relaxamento do músculo liso é dependente de GMPc, logo a ação das PDE-5 favorece o estado contraído das células musculares. Com a inibição da PDE-5 pelo sildenafil, ocorre um aumento na quantidade de GMPc disponível nas células, maximizando a sinalização responsável pelo relaxamento do músculo liso [54].

Embora o sildenafil seja uma das drogas mais utilizadas na prática clínica para o tratamento da DE, nem todos pacientes respondem da mesma maneira a esse iPDE-5. Cerca de 35% dos pacientes que fazem uso do sildenafil não tem uma resposta favorável a essa droga. Já na população de pacientes com DE e DM a porcentagem de pacientes não responsivos ao sildenafil chega a 50% [31] Pacientes com DE portadores do alelo 4a para o VNTR no intron 4 e do alelo Asp para o SNP Glu298Asp do gene da eNOS respondem melhor ao sildenafil comparado aos portadores dos alelos 4b e Glu, respectivamente [55, 56]. Embora alguns fatores que pioram a resposta ao sildenafil em pacientes com DE já tenham sido descritos, são necessários mais estudos para elucidar as causas das respostas não favoráveis a essa droga.

2 - OBJETIVOS

Hipotetizando que os níveis de NO e o estresse oxidativo podem contribuir tanto para a severidade de DE quanto para a resposta ao sildenafil durante o tratamento desta doença e que a resposta ao sildenafil em pacientes com DE pode também ser afetada por polimorfismos no gene da eNOS, os objetivos do presente trabalho foram:

- Primeiro estudo: avaliar se há associação entre resposta ao sildenafil com polimorfismos no gene da eNOS e haplótipos da eNOS
- Segundo estudo: avaliar se há correlação da resposta ao sildenafil e severidade da DE com parâmetros da formação de NO e de estresse oxidativo.

3 - CAPÍTULO

CAPÍTULO 1

ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE GENOTYPES AND HAPLOTYPES MODIFY THE RESPONSES TO SILDENAFIL IN PATIENTS WITH ERECTILE DYSFUNCTION

Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction

JJ Muniz¹, R Lacchini²,
TO Rinaldi², YTDA Nobre³,
AJ Cologna³, ACP Martins³
and JE Tanus-Santos²

¹Department of Pharmacology, State University of Campinas, Campinas, Brazil; ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil and ³Department of Surgery and Anatomy, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, Brazil

Correspondence:

Dr JE Tanus-Santos, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Avenue Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil.
E-mails: tanus@fmrp.usp.br and tanussantos@yahoo.com

Erectile dysfunction (ED) is usually treated with sildenafil. Although genetic polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene may impair endogenous NO formation, there is little information about how eNOS polymorphisms and haplotypes affect the responses to sildenafil. We studied 118 patients; 63 patients had ED secondary to radical prostatectomy (PED) and 55 had organic, clinical ED. eNOS genotypes for three eNOS polymorphisms (T^{-786C}, rs2070744; a variable number of tandem repeats (VNTR) in intron 4; and Glu298Asp, rs1799983) were determined, and eNOS haplotypes were estimated using PHASE 2.1. The clinical responses to sildenafil were evaluated and the patients were classified as good responders (GR) or poor responders (PR) when their changes in five-item version of International Index for Erectile Function questionnaire were above or below the median value. The TC/CC genotypes and the C allele for the T^{-786C} polymorphism were more common in GR, compared with PR patients with PED. However, the 4b4a/4a4a genotypes and the 4a allele for the VNTR polymorphism in intron 4 were more common in GR, compared with PR patients with clinical ED. The C-4a-Glu haplotype was more common in GR than in PR patients with PED. Conversely, the T-4b-Asp haplotype was less common in GR than in PR patients with PED. No other significant differences were found. Our findings show evidence that eNOS polymorphisms affect the responses of PED and clinical ED patients to sildenafil.

The Pharmacogenomics Journal advance online publication, 8 November 2011; doi:10.1038/tpj.2011.49

Keywords: eNOS; erectile dysfunction; haplotype; polymorphisms; prostatectomy; sildenafil

Introduction

Erectile dysfunction (ED) is a very common disorder with organic, psychological and mixed origins.¹ However, there is now clear evidence supporting the notion that ED is a vascular disease affecting the endothelium,² thus explaining how several cardiovascular risk factors increase the risk of ED.^{3,4} Although ED may be due to a neurogenic cause,⁵ it may be a result of injury to the cavernous nerves following radical prostatectomy.^{6,7}

Nitric oxide (NO) is a key mediator involved in penile erection⁸ and this molecule is produced from L-arginine by different NO synthases (NOS) including the neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible NOS. Importantly, impaired NO production by nNOS or eNOS may affect the start and maintenance

Received 12 July 2011; revised 9 September 2011; accepted 5 October 2011

of penile erection.^{1,6,9} Therefore, drugs that improve NO signaling have been used to treat ED. Indeed, phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors, such as sildenafil, are usually prescribed to patients with ED.^{10,11} Their use is justified by the fact that PDE-5 hydrolyses cyclic guanosine monophosphate and terminates NO signaling. Conversely, PDE-5 inhibitors increase intracellular cyclic guanosine monophosphate levels, thus improving ED.^{8,11,12} However, it is possible that genetic variations in the gene encoding eNOS may affect the responses to PDE-5 inhibitors.

Genetic polymorphisms in the eNOS gene may impair endogenous NO formation,^{13–15} and these findings may explain how the eNOS gene polymorphisms are associated with ED^{16–20} and with other cardiovascular diseases.^{21–24} The most studied eNOS polymorphisms include a single-nucleotide polymorphism at the –786 position of the promoter region (T^{–786}C, rs2070744), a variable number of tandem repeats (VNTR) in intron 4 (common alleles: 4b and 4a), and a single-nucleotide polymorphism in the exon 7 (G⁸⁹⁴T, rs1799983), which results in an amino acid change (Glu298Asp). However, although eNOS polymorphisms may modify the responses to drugs that modify NO bioavailability,^{25,26} there is only one study showing significant effects of individual eNOS polymorphisms on the responses to sildenafil,²⁷ and no previous study has examined whether eNOS haplotypes modify the responsiveness to sildenafil.

In the present study, we hypothesized that eNOS polymorphisms could affect the responses of patients with organic ED to sildenafil, especially when the effects of the eNOS gene variants are combined within the eNOS haplotypes. Moreover, we examined for the first time how eNOS polymorphisms (and haplotypes) affect the responses of patients with ED secondary to radical prostatectomy (PED) that were treated with sildenafil.

Subjects and methods

Subjects

The present work was carried out in accordance to the Helsinki declaration, and was approved by the Institutional Review Board at the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto. Informed consent was obtained from each participant. We recruited 118 patients with a medical diagnose of ED, which was already being followed up at the Urology Outpatient Clinic of Department of Surgery. We included patients with age between 40 and 80 years that had complaints regarding sexual activity and medical diagnosis of erectile function. Erectile function was evaluated before and after the use of sildenafil, using the five-item version of International Index for Erectile Function (5-IIEF) questionnaire, the ED domain.²⁸ The patients were divided into two study groups: 63 patients had postoperative ED, because they underwent radical prostatectomy, and 55 patients had clinical (organic) ED. We assessed the responses to sildenafil for each patient by subtracting the 5-IIEF score before treatment with sildenafil from the 5-IIEF score after treatment with sildenafil, and this difference was defined as Δ 5-IIEF. The response to sildenafil

was evaluated after at least eight attempts of intercourse in which sildenafil was used at 50 mg or 100 mg dose. On the basis of the responses to sildenafil, the patients were divided into two groups: good responders (GR) or poor responders (PR) if their Δ 5-IIEF was higher or lower than the median Δ 5-IIEF, respectively. This analysis was performed independently for postoperative ED and for clinical ED patients. We excluded from the study those patients that did not use at least eight doses of sildenafil, or that had endocrine disorders, psychiatric disorders, neurogenic bladder dysfunction, hypogonadism, penile implants, cerebrovascular accident, central nervous system trauma, follow-up of radical prostatectomy shorter than 1 year from surgery, and anatomical abnormalities such as Peyronie's disease.

Genotyping

Genotyping for the T^{–786}C and Glu298Asp polymorphisms. Venous blood samples were collected, and genomic DNA was extracted from the cellular component of 1 ml of whole blood and stored at –20 °C until analyzed. Genotypes for the eNOS T^{–786}C (rs2070744) and Glu298Asp (rs1799983) polymorphisms were determined by Taqman Allele Discrimination assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using real-time PCR. The probes and primers used for the T^{–786}C genotyping assay were customized as follows: forward 5'-ACCAGGGCATCAAGCTCTTC-3', reverse 5'-GCA GGTGAGCAGAGAGACTAG-3', and probes 5'-CAGGGTCAG CC[G/A]GCCA-3'. TaqMan PCR was performed in a total volume of 12 μ l (3 ng of DNA, 1 \times TaqMan master mix, 1 \times assay mix) placed in 96-well PCR plates. Fluorescence from PCR amplification was detected using Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and analyzed with the manufacturer's software. Probes and primers used in Glu298Asp assay were designed by Applied Biosystems (ID: C_3219460-20). TaqMan PCR and fluorescence reading were performed as described above for the T^{–786}C polymorphism.

Genotyping for the VNTR polymorphism in intron 4. Genotypes for the VNTR polymorphism in intron 4 were determined by PCR using the primers 5'-AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTG-3' (forward) and 5'-TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3' (reverse). PCR was performed in 20- μ l reaction volume that included approximately 300 ng of template genomic DNA, 0.25 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1 \times PCR buffer and 1 U of DNA Taq Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). The PCR reactions were heated to 94 °C for 4 min for initial denaturation and underwent 35 cycles at 94 °C for 30 s for denaturation, 63 °C for 30 s for annealing, and 72 °C for 1 min for extension. A final step of extension was conducted at 72 °C for 4 min. PCR generated products of 393, 420 and 447 bp, which correspond to the eNOS alleles 4a, 4b and 4c, respectively. Products were separated by electrophoresis in 8% polyacrylamide gels and visualized by silver staining as previously described.²⁹

Laboratory analyses

Serum lipid profile (total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol), glucose, testosterone, urea

and creatinine concentrations were measured with commercially available kits using standardized techniques. Low-density lipoprotein concentration was calculated according to the Friedewald's formula.

Statistical analysis

Clinical features and biochemical parameters of the studied groups were compared by unpaired *t*-test (parametric data), by Mann-Whitney test (non-parametric data), or by χ^2 -test (categorical variables). Differences in allelic and genotypes distributions and deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium were tested by χ^2 -test. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

Haplotypes were estimated using the program PHASE version 2.1 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>). The possible haplotypes including genetic variants of the three polymorphisms studied here in the *eNOS* gene (T⁻⁷⁸⁶C, intron 4 and Glu298Asp) were H1 (T 4b Glu), H2 (T 4a Glu), H3 (T 4b Asp), H4 (T 4a Asp), H5 (C 4b Glu), H6 (C 4a Glu), H7 (C 4b Asp) and H8 (C 4a Asp). Only the haplotypes with observed frequencies >1% were taken into consideration. Differences in haplotype frequencies among groups were further tested using χ^2 -test, considering *P*<0.00833 as statistically significant (after Bonferroni's correction: 0.05/number of observed haplotypes).

Results

Table 1 summarizes the clinical and laboratory characteristics of the patients enrolled in this study. We studied 63 patients with postoperative ED, secondary to radical prostatectomy, and 55 patients with organic (clinical) ED. Although both clinical and postoperative groups were very similar with respect to their clinical features, there were minor differences in age, testosterone levels and frequency of diabetes between groups. These differences are not relevant, because the main goal of the present study was to examine the effects of eNOS polymorphisms on the responses to sildenafil in each group of patients, and we carried out independent analysis in postoperative and in clinical ED patients.

The genotypes distributions for all eNOS polymorphisms did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium in both ED groups (*P*>0.05). The genotypes and allele distributions were similar in both postoperative and clinical ED groups (*P*>0.05; Table 2). The analysis of genotypes for the intron 4 VNTR polymorphism showed that the rare 4c allele (which corresponds to six repeats of the 27bp fragment) was found in only four subjects in the postoperative ED group (Table 2). To simplify the statistical analysis, we grouped the 4c allele with the 4a allele in our statistical tests. In parallel with genotypes results, we found similar eNOS haplotypes distribution in the postoperative and in the clinical ED groups (*P*>0.05; Table 3).

To investigate whether eNOS polymorphisms affect the responsiveness to sildenafil, we carried out an independent analysis for each group of ED patients. We evaluated the 5-IIEF²⁸ before and after the use of sildenafil, and the change in 5-IIEF (Δ 5-IIEF) was calculated for each patient. For each

Table 1 Clinical and laboratory characteristics of subjects

	Postoperative ED	Clinical ED
N	63	55
Age (years)	64.8 ± 6.4	55.5 ± 10.9
Ethnicity (White/non-White)	29/34	26/29
Waist circumference (cm)	98.5 ± 12.9	101.4 ± 12.5
BMI (kg m ⁻²)	27.8 ± 4.1	28.4 ± 4.7
Physical exercise (% of practitioners)	62	55
<i>Smoking</i>		
Never smoker (n)	27	15
Ex-smoker (n)	30	29
Current smoker (n)	6	11
SBP (mm Hg)	145 ± 22	142 ± 18
DBP (mm Hg)	93 ± 12	91 ± 11
HDL (mg dl ⁻¹)	39.0 ± 5.6	40.5 ± 6.7
LDL (mg dl ⁻¹)	100.1 ± 38.2	111.9 ± 34.7
Total cholesterol (mg dl ⁻¹)	174.0 ± 44.3	183.1 ± 32.4
Triglycerides (mg dl ⁻¹)	155.7 ± 81.3	148.4 ± 81.1
Fasting glucose (mg dl ⁻¹)	120.7 ± 40.4	118.4 ± 40.6
Urea (mg dl ⁻¹)	32.0 ± 13.4	33.0 ± 12.9
Creatinine (mg dl ⁻¹)	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.4
Testosterone (ng dl ⁻¹)	312 ± 114	356 ± 115
Hypertensives (%)	59	47
Diabetics (%)	22	44
<i>IIEF-5 score</i>		
Pre sildenafil	8.9 ± 5.6	9.5 ± 6.7
Post sildenafil	13.5 ± 7.8	15.5 ± 9.1

Abbreviations: BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; ED, erectile dysfunction; HDL, high-density lipoprotein; IIEF-5, International Index of Erectile Function (five-item version); LDL, low-density lipoprotein; SBP, systolic blood pressure.

Values are expressed as means ± s.d., or as frequency (%).

ED group, the patients were classified as GR or PR when their Δ 5-IIEF was above or below the median Δ 5-IIEF value of the ED group, respectively.

Interestingly, the analysis of results for postoperative ED patients showed higher frequencies of the TC and CC genotypes, and of the C allele for the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism in GR compared with PR (*P*<0.05; Table 4). However, no significant differences were found in this group of ED patients with respect to the VNTR polymorphism in intron 4, and a minor difference was found for the Glu298Asp single-nucleotide polymorphism (Table 4).

The analysis of results for clinical ED patients showed higher frequencies of the 4b4a and 4a4a genotypes, and of the 4a allele for VNTR polymorphism in intron 4 in GR compared with PR (*P*<0.05; Table 5). However, no significant differences were found in this group of ED patients with respect to the T⁻⁷⁸⁶C to the Glu298Asp single-nucleotide polymorphisms (*P*>0.05; Table 5).

We evaluated whether the eNOS gene variants combined within eNOS haplotypes affect the responsiveness to sildenafil in the two groups of ED patients. Interestingly, we found that the H6 haplotype (C 4a Glu) is more commonly found in GR than in PR patients with postoperative ED (*P*<0.0083; Table 6). Conversely, the H3

Table 2 Genotypes and alleles frequencies distributions in patients with postoperative or clinical ED

	Genotype	Groups		χ^2 -test	P-value
		Postoperative ED (n = 63)	Clinical ED (n = 55)		
T ⁻⁷⁸⁶ C	TT	46 (29)	47 (26)	1.0010	0.6063
	TC	43 (27)	46 (25)		
	CC	11 (7)	7 (4)		
Intron 4	4b4b	67 (42)	73 (40)	3.8570	0.1454
	4b4a	25 (16)	25 (14)		
	4a4a	3 (2)	2 (1)		
	4b4c	3 (2)	—		
	4c4c	2 (1)	—		
Glu298Asp	GluGlu	62 (39)	60 (33)	0.0916	0.9552
	GluAsp	33 (21)	35 (19)		
	AspAsp	5 (3)	5 (3)		

	Alleles	Postoperative ED	Clinical ED	χ^2 -test	P-value
T ⁻⁷⁸⁶ C	T	67 (85)	70 (77)		
	C	33 (41)	30 (33)		
Intron 4	4b	81 (102)	85 (94)	0.5670	0.4515
	4a	16 (20)	15 (16)		
	4c	3 (4)	—		
Glu298Asp	Glu	79 (99)	77 (85)	0.1166	0.7328
	Asp	21 (27)	23 (25)		

Abbreviation: ED, erectile dysfunction.

The frequencies are shown as % (n).

The rare variant 4c was grouped with the variant 4a before statistical analysis of intron 4 polymorphism.

No significant differences.

Table 3 Estimated haplotypes frequencies distributions in patients with postoperative or clinical ED

Haplotypes				Postoperative ED	Clinical ED
T ⁻⁷⁸⁶ C	Intron4	Glu298Asp		(n = 126)	(n = 110)
H1	T	4b	Glu	52 (66)	59 (65)
H2	T	4a	Glu	10 (12)	6 (7)
H3	T	4b	Asp	6 (7)	5 (5)
H4	T	4a	Asp	—	—
H5	C	4b	Glu	7 (9)	4 (4)
H6	C	4a	Glu	9 (12)	8 (9)
H7	C	4b	Asp	16 (20)	18 (20)
H8	C	4a	Asp	—	—

Abbreviation: ED, erectile dysfunction.

The frequencies are shown as % (n).

No significant differences.

haplotype (T 4b Asp) is less commonly found in GR than in PR patients with postoperative ED; however, this result did not resist to the Bonferroni's correction for comparisons (Table 6). Finally, no significant differences in eNOS haplotypes distributions were found when GR and PR patients with clinical ED were compared (Table 6).

Discussion

The main findings of this study were: i) the C allele for T⁻⁷⁸⁶C polymorphism is associated with better responses of postoperative ED patients to sildenafil, whereas the 4a allele for the intron 4 VNTR polymorphism is associated with better responses of clinical ED patients to sildenafil; ii) eNOS haplotypes may modify the responses to sildenafil in postoperative ED patients; specifically, the H6 haplotype is associated with a better response to sildenafil; iii) the Glu298Asp polymorphism had minor effects on the responses of postoperative ED patients to sildenafil. To our knowledge, this is the first study to explore the association of eNOS haplotypes and responsiveness of ED patients to sildenafil.

The functionality of the three polymorphisms studied here has been demonstrated in previous studies. The C allele for the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism decreases the transcriptional activity of the eNOS gene by 50%.³⁰ The 4a allele for the intronic VNTR polymorphism is associated with lower levels of small interference RNA, thus leading to higher eNOS expression in comparison with the 4b allele.³¹ The functional consequences of the Glu298Asp polymorphism result in altered ligation of eNOS to caveolin-1, which is essential

Table 4 Distribution of genotypes and alleles for eNOS polymorphisms in postoperative ED patients divided in PR and GR responders to sildenafil

	Genotype	Postoperative ED		P-value	OR (95% CI)
		PR	GR		
T ⁻⁷⁸⁶ C	TT	58 (18)	33 (10)	—	1.0000 (reference)
	TC	36 (11)	50 (15)	0.0036 ^a	0.4097 (0.2236–0.7504)
	CC	6 (2)	17 (5)	0.0011 ^a	0.2008 (0.0721–0.5593)
	χ^2 -test P-value	14.41 0.0007 ^a			
Intron 4	4b4b	71 (22)	63 (19)	—	1.0000 (reference)
	4b4a	26 (8)	30 (9)	0.4098	0.7690 (0.4115–1.4370)
	4a4a	3 (1)	7 (2)	0.1607	0.3803 (0.0943–1.5340)
	χ^2 -test P-value	2.363 0.3068			
Glu298Asp	Glu, Glu	55 (17)	67 (20)	—	1.0000 (reference)
	Glu, Asp	42 (13)	27 (8)	0.0360 ^a	1.8950 (1.0390–3.4560)
	Asp, Asp	3 (1)	6 (2)	0.3556	0.6091 (0.1456–2.5490)
	χ^2 -test P-value	5.441 0.0658			
	Allele	PR	GR	P-value	OR (95% CI)
T ⁻⁷⁸⁶ C	T	76 (47)	58 (35)	—	1.0000 (reference)
	C	24 (15)	42 (25)	0.0068 ^a	0.4361 (0.2377–0.8002)
Intron4	4b	84 (52)	78 (47)	—	1.0000 (reference)
	4a	16 (10)	22 (13)	0.2795	0.6753 (0.3307–1.3790)
Glu298Asp	Glu	76 (47)	80 (48)	—	1.0000 (reference)
	Asp	24 (15)	20 (12)	0.4947	1.2630 (0.6454–2.4720)

Abbreviations: CI, confidence interval; ED, erectile dysfunction; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GR, good response; OR, odds ratio; PR, poor response. The frequencies are shown as % (n).

^aP<0.05 versus reference genotype/allele (χ^2 -test).

for eNOS activity.³² Although molecular mechanisms have been demonstrated, clinical studies showed minor (if any) effects of individual eNOS polymorphisms on relevant markers of NO formation.^{13–15} Conversely, eNOS haplotypes apparently have significant effects on endogenous NO formation.^{13–15}

Whereas the polymorphisms studied here were associated with ED in previous studies,^{16–20} there is only one previous study, suggesting that individual eNOS polymorphisms affect the responses to sildenafil.²⁷ The authors found the 4a allele for the intronic VNTR polymorphism associated with better responses to sildenafil in patients with ED associated with multiple causes, and our results from clinical ED patients align with these previous findings.²⁷ Although we have not addressed the molecular mechanisms underlying the improved responses to sildenafil in carriers of the 4a allele, it is possible that higher-tissue eNOS expression associated with this polymorphism³¹ increases tissue NO activity, and this may enhance the responses to PDE-5 inhibitors. This effect associated with the 4a allele may be

especially relevant in patients with clinical ED, as this clinical condition clearly involves the endothelium.²

Our findings in clinical ED were different from those in postoperative ED. The T⁻⁷⁸⁶C polymorphism modified the responses to sildenafil in postoperative ED, and the C allele for this polymorphism apparently improves the responses to sildenafil in these patients as compared with the T allele. These patients have undergone prostatectomy and were exposed to variable levels of nerve injury, which impairs the initial NO wave produced by nNOS in non-cholinergic non-adrenergic nerve fibers.³³ However, these patients may not have the same extent of endothelial dysfunction in their penile vessels as compared with clinical ED patients. Although unproven, it is possible that postoperative ED patients have much better endothelial function and are more similar to healthy subjects than clinical ED patients. Interestingly, the improved responses to sildenafil in carriers of the C allele versus non carriers is consistent with previous findings showing significant increases in NO bioavailability in healthy male subjects carrying the C allele (but not in

Table 5 Distribution of genotypes and alleles for eNOS polymorphisms in clinical ED patients divided in PR and GR responders to sildenafil

	Genotype	Clinical ED		P-value	OR (95% CI)
		PR	GR		
T ⁻⁷⁸⁶ C	TT	50 (12)	50 (12)	—	1.0000 (reference)
	TC	46 (11)	42 (10)	0.7558	1.0950 (0.6173–1.9430)
	CC	4 (1)	8 (2)	0.2749	0.5000 (0.1414–1.7680)
	χ^2 -test	1.515			
	P-value	0.4688			
Intron 4	4b4b	83 (20)	67 (16)	—	1.0000 (reference)
	4b4a	17 (4)	29 (7)	0.0292 ^a	0.4732 (0.2398–0.9340)
	4a4a	0 (0)	4 (1)	0.0284 ^a	0.0898 (0.0047–1.6990)
	χ^2 -test	8.837			
	P-value	0.0121 ^a			
Glu298Asp	GluGlu	54 (13)	63 (15)	—	1.0000 (reference)
	GluAsp	38 (9)	33 (8)	0.3273	1.3430 (0.7436–2.4270)
	AspAsp	8 (2)	4 (1)	0.1756	2.3333 (0.6656–8.1800)
	χ^2 -test	2.378			
	P-value	0.3046			
	Allele	PR	GR	P-value	OR (95% CI)
T ⁻⁷⁸⁶ C	T	73 (35)	71 (34)	—	1.0000 (reference)
	C	27 (13)	29 (14)	0.7528	0.9055 (0.4882–1.6800)
Intron4	4b	92 (44)	81 (39)	—	1.0000 (reference)
	4a	8 (4)	19 (9)	0.0228 ^a	0.3707 (0.1540–0.8925)
Glu298Asp	Glu	73 (35)	79 (38)	—	1.0000 (reference)
	Asp	27 (13)	21 (10)	0.3205	1.3910 (0.7241–2.6740)

Abbreviations: CI, confidence interval; ED, erectile dysfunction; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GR, good response; OR, odds ratio; PR, poor response. The frequencies are shown as % (n).

^aP<0.05 versus reference genotype/allele (χ^2 -test).

Table 6 Estimated haplotypes frequencies in postoperative and clinical ED patients divided in PR and GR responders to sildenafil

Haplotype	Postoperative ED		P-value	OR (95% CI) ^a	Clinical ED		P-value	OR (95% CI) ^b
	PR	GR			PR	GR		
H1 T 4b Glu	53 (33)	50 (30)	—	1.0000 (reference)	63 (30)	0.56 (27)	—	1.0000 (reference)
H2 T 4a Glu	13 (8)	7 (4)	0.2663	1.7520 (0.6464–4.7480)	4 (2)	11 (5)	0.0551	0.3232 (0.0974–1.0730)
H3 T 4b Asp	10 (6)	2 (1)	0.0358**	4.7170 (0.9843–22.600)	6 (3)	4 (2)	0.6673	1.3330 (0.3577–4.9700)
H5 C 4b Glu	6 (4)	8 (5)	0.5460	0.7075 (0.2292–2.1840)	2 (1)	4 (2)	0.3482	0.4444 (0.0784–2.5210)
H6 C 4a Glu	3 (2)	15 (9)	0.0063*	0.1887 (0.0515–0.6914)	4 (2)	8 (4)	0.1953	0.4444 (0.1269–1.5560)
H7 C 4b Asp	15 (9)	18 (11)	0.5484	0.7862 (0.3579–1.7270)	21 (10)	17 (8)	0.8027	1.0980 (0.5271–2.2880)
	χ^2 -test	15.780			6.449			
	P-value	0.0075*			0.2606			

Abbreviations: CI, confidence interval; ED, erectile dysfunction; GR, good response; OR, odds ratio; PR, poor response. The frequencies are shown as % (n).

^aOR for postoperative ED.

^bOR for clinical ED.

*P<0.00833; statistically significant after Bonferroni's correction for multiple comparisons.

**P<0.05; however, not statistically significant after Bonferroni's correction for multiple comparisons.

subjects carrying the T allele) after treatment with atorvastatin.²⁵ In other words, if the C allele reduces eNOS expression and NO activity,³⁰ it is possible that apparently healthy subjects carrying this allele will respond better to drugs that activate the NO-cyclic guanosine monophosphate pathway than those carrying the T allele, as suggested by our results in postoperative ED patients and in a previous study examining the effects of atorvastatin on endogenous NO production.²⁵ The differences between postoperative and clinical ED may well reflect major differences in the pathogenesis between these two conditions, especially with respect to the severity of vascular dysfunction.

The analysis of eNOS haplotypes may offer improved genetic information than the analysis of genetic markers one by one.²² In fact, although we found minor effects (if any) for the Glu298Asp polymorphism on the responses to sildenafil, thus supporting a previous report,²⁷ it is possible that this polymorphism may interact with the other eNOS polymorphisms. Interestingly, we found the H6 haplotype associated with improved responses, and the H3 haplotype possibly associated with worse responses to sildenafil in postoperative ED. We do not have a precise explanation for the molecular mechanisms possibly explaining such an association, and these eNOS haplotypes were not associated with high or low endogenous NO formation.¹³ However, that study included only healthy subjects,¹³ and it is possible that eNOS polymorphism interact with other factors involved in the pathogenesis of disease conditions. It is intriguing that the H6 and the H3 haplotypes, which were associated with good and poor responses to sildenafil, respectively, share no common allele (C 4a Glu versus T 4b Asp), thus suggesting that there must be a molecular mechanism possibly related with these differences in eNOS haplotypes.

There are clear interethnic differences in eNOS genotypes and haplotypes distributions when Blacks and Whites are compared,^{34,35} and therefore, ethnicity could have an effect on the responses to sildenafil. However, we found that similar improvement of erectile function in both Black and White subjects in the present study ($P > 0.97$ for postoperative ED and $P > 0.39$ for clinical ED patients).

Some limitations of the present study should be taken into consideration. Firstly, although we studied a reasonable number of ED patients, our study may have not detected minor effects of eNOS polymorphisms or haplotypes. However, minor effects may not be so relevant from the clinical standpoint. Secondly, it would have been interesting to study patients with ED associated with particular medical conditions. Thirdly, the number of diabetic patients was different in the two ED groups, and it is possible that diabetes mellitus may have affected the responses to sildenafil. However, this study has not been designed to study how this issue. Finally, it would be interesting to study how eNOS polymorphisms may interact with polymorphisms in other genes downstream in the NO signaling pathway. In addition, it is possible that other polymorphisms (such as those found in *nNOS* gene) may affect the responses to sildenafil. However, our results support the idea

that eNOS polymorphisms may affect therapeutic responses to drugs used in to treat cardiovascular diseases.^{36,37}

In conclusion, we found evidence that eNOS genetic polymorphisms affect the responses of postoperative and clinical ED patients to sildenafil. It remains to be determined whether subjects with the worst responses to sildenafil would benefit from a more aggressive therapy including other drugs that may upregulate NO formation, such as statins,²⁵ thus possibly improving the responses to sildenafil,³⁸ or other drugs affecting the cardiovascular system.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- 1 McVary KT. Clinical practice. Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 2007; **357**: 2472–2481.
- 2 Solomon H, Man JW, Jackson G. Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator. *Heart* 2003; **89**: 251–253.
- 3 Klöner R. Erectile dysfunction and hypertension. *Int J Impot Res* 2007; **19**: 296–302.
- 4 Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Rotatori F, Briganti A, Salonia A et al. Common grounds for erectile dysfunction and coronary artery disease. *Curr Opin Urol* 2004; **14**: 361–365.
- 5 Mills JN, Barqawi A, Koul S, Koul H, Meacham RB. The molecular basis of erectile dysfunction: from bench to bedside. *Rev Urol* 2005; **7**: 128–134.
- 6 Awad A, Alsaïd B, Bessedé T, Droupy S, Benoit G. Evolution in the concept of erection anatomy. *Surg Radiol Anat* 2011; **33**: 301–312.
- 7 Marien T, Sankin A, Lepor H. Factors predicting preservation of erectile function in men undergoing open radical retropubic prostatectomy. *J Urol* 2009; **181**: 1817–1822.
- 8 Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther* 2005; **106**: 233–266.
- 9 Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. *J Androl* 2003; **24**: S17–S37.
- 10 Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 689–702.
- 11 Carson CC, Lue TF. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *BJU Int* 2005; **96**: 257–280.
- 12 Sandner P, Hutter J, Tinel H, Ziegelbauer K, Bischoff E. PDE5 inhibitors beyond erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2007; **19**: 533–543.
- 13 Metzger IF, Sertório JTC, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med* 2007; **43**: 987–992.
- 14 Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagasaki S, Desta Z, Flockhart DA et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet Genomics* 2005; **15**: 565–570.
- 15 Metzger IF, Ishizawa MH, Rios-Santos F, Carvalho WA, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects. *Pharmacogenomics J* 2011; **11**: 393–399.
- 16 Lee Y-C, Wu W-J, Liu C-C, Wang C-J, Li W-M, Huang C-H et al. The associations among eNOS G894T gene polymorphism, erectile dys-

- function, and benign prostate hyperplasia-related lower urinary tract symptoms. *J Sex Med* 2009; **6**: 3158–3165.
- 17 Rosas-Vargas H, Coral-Vazquez RM, Tapia R, Borja JL, Salas RA, Salamanca F. Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism is a risk factor for erectile dysfunction in the Mexican Mestizo population. *J Androl* 2004; **25**: 728–732.
 - 18 Safarinejad MR, Khoshdel A, Shekarchi B, Taghva A, Safarinejad S. Association of the T-786C, G894T and 4a/4b polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene with vasculogenic erectile dysfunction in Iranian subjects. *BJU Int* 2011; **107**: 1994–2001.
 - 19 Erol B, Bozdogan G, Akduman B, Dursun A, Bozdogan S, Onem K et al. eNOS gene intron 4 VNTR and exon 7-G894T polymorphisms in Turkish men with erectile dysfunction: a case control study. *J Sex Med* 2009; **6**: 1423–1429.
 - 20 Sinici I, Guven EO, Serefoglu E, Hayran M. T-786C polymorphism in promoter of eNOS gene as genetic risk factor in patients with erectile dysfunction in Turkish population. *Urology* 2010; **75**: 955–960.
 - 21 Napoli C, Ignarro LJ. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and carotid artery atherosclerosis. *J Clin Pathol* 2007; **60**: 341–344.
 - 22 Sandrim VC, Coelho EB, Nobre F, Arado GM, Lanchote VL, Tanus-Santos JE. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. *Atherosclerosis* 2006; **186**: 428–432.
 - 23 Sandrim VC, de Syllos RWC, Lisboa HRK, Tres GS, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2006; **189**: 241–246.
 - 24 Sandrim VC, de Syllos RWC, Lisboa HRK, Tres GS, Tanus-Santos JE. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide* 2007; **16**: 348–355.
 - 25 Nagassaki S, Sertorio JT, Metzger IF, Bem AF, Rocha JB, Tanus-Santos JE. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med* 2006; **41**: 1044–1049.
 - 26 Lacchini R, Silva PS, Tanus-Santos JE. A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; **106**: 357–361.
 - 27 Peskircioglu L, Atac FB, Erdem SR, Deveci S, Verdi H, Ozkardes H. The association between intron 4 VNTR, E298A and IVF 23+10 G/T polymorphisms of eNOS gene and sildenafil responsiveness in patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2007; **19**: 149–153.
 - 28 Rosen RC, Riley A, Wagner G, Osterloh IH, Kirkpatrick J, Mishra A. The international index of erectile function (IIEF): a multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction. *Urology* 1997; **49**: 822–830.
 - 29 Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 719–725.
 - 30 Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a –786T->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 2629–2637.
 - 31 Zhang MX, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li XN, Chen L et al. Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 3997–4005.
 - 32 Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J* 2007; **21**: 2655–2663.
 - 33 Podlasek CA, Gonzalez CM, Zelner DJ, Jiang HB, McKenna KE, McVary KT. Analysis of NOS isoform changes in a post radical prostatectomy model of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2001; **13**(Suppl 5): S1–15.
 - 34 Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagassaki S, Sandrim VC, Correa RX et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide* 2005; **12**: 177–182.
 - 35 Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Simoes AL, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes in Amerindians. *DNA Cell Biol* 2009; **28**: 329–334.
 - 36 Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, Rego EM, Tanus-Santos JE. Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis* 2007; **193**: 438–444.
 - 37 Sandrim VC, Palei AC, Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. *Pharmacogenomics J* 2010; **10**: 40–45.
 - 38 Castro MM, Rizzi E, Rascado RR, Nagassaki S, Bendhack LM, Tanus-Santos JE. Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2004; **498**: 189–194.

CAPÍTULO 2

LOW NITRIC OXIDE BIOAVAILABILITY IS ASSOCIATED WITH BETTER RESPONSES TO SILDENAFIL IN PATIENTS WITH ERECTILE DYSFUNCTION

Low nitric oxide bioavailability is associated with better responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction

Jaqueline J. Muniz¹, Riccardo Lacchini², Jonas T.C. Sertório¹, Alceu A. Jordão Jr³, Yuri T.D.A. Nobre⁴, Silvio Tucci Jr⁴, Antônio C.P. Martins⁴, Jose E. Tanus-Santos^{2,*}

¹ Department of Pharmacology, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil;

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil

³ Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil

⁴ Department of Surgery and Anatomy, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, SP;

* Corresponding author: Jose Eduardo Tanus-Santos, MD, PhD.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine of Ribeirao Preto

University of Sao Paulo

Av. Bandeirantes, 3900

14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

FAX: +55 16 3602 0220

Phone: +55 16 3602 3163

E-mail: tanus@fmrp.usp.br; tanussantos@yahoo.com

Running title: NO and the responses to sildenafil

Abstract

Erectile dysfunction (ED) is a multifactorial disease associated with vascular dysfunction, low nitric oxide (NO) bioavailability and oxidative stress. However, it is not known whether low NO bioavailability and oxidative stress affect the responsiveness of ED patients to sildenafil. We tested this hypothesis by studying 28 healthy subjects (Control group), 26 patients with ED without comorbidities (ED group), and 18 patients with ED and diabetes mellitus (ED/DM group). The International Index for Erectile Function (IIEF) questionnaire was used to assess the erectile function of all participants, and responsiveness sildenafil was assessed as the percentage of change in five-item version of IIEF score before and after sildenafil treatment. Levels of whole blood nitrite, antioxidants markers (ferric reducing ability of plasma [FRAP] and reduced glutathione), and oxidative stress markers (thiobarbituric acid reactive substance and protein carbonyl) were determined. We found a negative correlation between whole blood nitrite levels and the responses to sildenafil in both ED groups ($P < 0.05$). FRAP correlated negatively with the responses to sildenafil in the ED/DM group ($P < 0.05$). No other significant associations were found. Our findings show evidence that low NO bioavailability is associated with better responses to sildenafil in patients with ED (with or without DM).

Keywords: Erectile dysfunction, nitric oxide, nitrite, oxidative stress, sildenafil.

Introduction

Erectile dysfunction (ED) is a common multifactorial disease associated with advancing age, lifestyle, and comorbidities such as cardiovascular diseases ¹ and diabetes mellitus (DM) ². A major cause of organic ED is vascular dysfunction ^{3,4}, which may be promoted by oxidative stress and impaired nitric oxide (NO) bioavailability^{5,6}. Indeed, these pathogenic alterations have been shown in ED ⁷⁻⁹, and ED manifests earlier than other symptoms in patients with DM ¹⁰, possibly as a consequence of vascular dysfunction¹¹. Although it is widely acknowledged that lower NO activity and oxidative stress are involved in ED, no previous study has examined whether these alterations affect the responses to drugs used in the therapy of ED.

Sildenafil is a phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitor and is widely used to treat ED^{12,13}. Its mechanism of action is based on increased intracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels, thus prolonging NO signaling in smooth muscle cells of cavernous tissue ^{13,14}. Although sildenafil is currently the first choice treatment for most ED patients ¹³, approximately 35% of the patients fail to respond^{15,16}. Patients with ED associated with DM have impaired vascular function and consequently are less responsive to PDE-5 inhibitors ^{17,18}. Therefore, it would be interesting to examine whether the responses of ED patients to sildenafil are associated with NO bioavailability or with oxidative stress markers.

In the present study, we hypothesized that levels of markers of NO formation and oxidative stress would be associated with the responsiveness to sildenafil in ED patients, with or without DM. We examined whether the concentrations of a relevant marker of endogenous NO formation (whole blood nitrite levels)¹⁹, and the concentrations of oxidative stress markers (ferric reducing ability of plasma, reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substances, and protein carbonyl levels)²⁰⁻²² correlate with the responses to sildenafil in patients with ED, and with disease severity.

Materials and methods

Subjects

This work was approved by the Human Research Ethics Committee at the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil. Each subject provided written informed consent and underwent a physical examination, IIEF questionnaire, and blood collection. All ED patients were recruited at the Urology Division from Clinics Hospital of Ribeirao Preto. In this study, we recruited 44 patients with clinically diagnosed ED, which were classified according to the results of International Index for Erectile Function (IIEF) questionnaire^{23,24} with scores < 26. These patients were then divided in two groups: 26 patients with ED (ED group), and 18 patients with ED and type 2 DM (ED/DM group). The responses to sildenafil were assessed as the percentage of change of five-item version of IIEF (5-IIEF) score (calculated as score after sildenafil minus the score before sildenafil). Twenty eight healthy men, paired by age, ethnicity and body mass index with our ED patients were recruited from general public and included in the Control Group. All these subjects had IIEF scores \geq 26 and reported no diseases, including hypertension and diabetes, and were not under any pharmacological treatment. The exclusion criteria for all groups were men with post-prostatectomy ED, premature ejaculation, Peyronie's disease, hypogonadism, hypothyroidism, and other endocrine and neurological disorders.

Blood samples were collected using Vacutainer tubes (Becton-Dickinson Sao Paulo, Brazil). Blood samples used to assess whole blood nitrite levels were quickly mixed with a ferricyanide-based nitrite preservation solution, as previously described²⁵, and stored at -20°C until evaluation. Plasma used to assess thiobarbituric acid reactive species (TBARS), carbonyl protein, reduced glutathione (GSH), and ferric reducing antioxidant power (FRAP) was obtained by centrifuging whole blood at 2.500rpm for 10 min and was stored at -70°C until analysis.

Laboratorial analyses

High density lipoprotein (HDL), total cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, and fasting glucose levels were measured in blood samples using commercially available kits (Lab Test, Brazil) with standardized techniques. The low density lipoprotein (LDL) concentration was calculated according to the Friedwald's formula.

Measurement of whole blood nitrite concentrations

The frozen samples mixed with the preservation solution were then deproteinized with a 1:1 volume of cold methanol and centrifuged at 11 800 rpm for 2 min. The whole blood nitrite content was analyzed using an ozone-based chemiluminescence assay, as previously described^{26,27}. Briefly, 200µL of the supernatant was injected into a solution of acidified tri-iodide, purged with nitrogen in-line with a gas-phase chemiluminescence NO analyzer (Sievers Model 280 NO Analyzer, Boulder, CO, USA)

Measurement of plasma TBARS

TBARS levels were determined as described previously²¹. Briefly, 100µL of plasma was mixed with 1mL of a solution containing 15% trichloroacetic acid (TCA), 0,38% thiobarbituric acid (TBA) and 0.25M of hydrochloric acid (HCl). The mixture was incubated at 100°C for 30 minutes. Samples were centrifuged for 10min at 3000rpm and the supernatant collected. Absorbance of the supernatants was measured in spectrophotometer at 535nm. The results were given as µmol/L.

Measurement of plasma carbonyl protein

The levels of carbonyl groups in plasma proteins were determined following a standardized method²⁰. Briefly, 100 µL of plasma samples were placed in two tubes as test and control. 400 µL of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) were added to test tubes, whereas 400 µL of 2.5 M HCl were added to controls tubes. The tubes were mixed and incubated in the dark for 1 hour. In the meantime, they were shaken every 15 min. Then 500 µL of 20%

trichloroacetic acid (TCA) were added to the tubes, which were immediately transferred and kept in ice for 5 min. Samples were then centrifuged for 10min at 9600rpm at 4°C, and the supernatant was discarded. Pellets were washed with 500 µL of 10% TCA once and with ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v) three times. The pellets were suspended in 500 µL of 6 M guanidine hydrochloride solution and kept at 37°C for 15min. Absorbance readings were made in spectrophotometer at 370 nm. Absorbance readings of control tubes were subtracted from test tubes and corrected by protein content.

Measurement of FRAP

The ferric reducing ability of plasma was measured using a previously described method²⁸. FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (0.3 M pH 3.6), 2,4,5-tripyridyl-s-triazine solution (0.01M) (TPTZ), and ferric chloride solution (0.02M) in 10:1:1 (v/v/v), respectively. 300µL of FRAP reagent was placed in tubes with 10µL of samples. A standard curve was obtained using dilutions of ferrous sulfate. Aliquots of 200µL of the mixture were kept at 37°C for 4 min and absorbance reading was made at 593 nm.

Measurement of GSH

Plasma GSH concentration was measured following a described assay²². Samples of 25 µL of plasma, distilled water, or standard curve dilutions were added to 1000 µL of Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (Tris-EDTA), and absorbance of the final mixtures was quantified at 412 nm in a spectrophotometer. Then, 25 µL of a 0,01 M 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) solution was added to each tube, which were kept at room temperature for 30 min. The final absorbance was quantified at 412 nm. The initial absorbance was subtracted from final absorbance as a background correction, and the results were expressed as mmol/L.

Statistical Analysis

The clinical and laboratory characteristics of the groups included in this study were compared by unpaired *t*-test (parametric data), by Mann–Whitney test (non-parametric data), or by chi-square test (categorical variables). The Spearman's correlation was calculated (StatView for Windows, Cary, NC, USA) for associations between the effects of sildenafil (Δ IIEF%) or degree of ED (IIEF) and the following markers: whole blood nitrite, FRAP, GSH, carbonyl protein, and TBARS levels. A P value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Table 1 summarizes the clinical and laboratory characteristics of 28 healthy controls and 44 patients with ED. Patients and healthy controls were similar with respect to age, ethnicity, waist circumference, and body mass index, systolic arterial pressure, diastolic arterial pressure, HDL and LD cholesterol levels, triglycerides, urea, creatinine, and also % of current smokers (Table 1; all $P>0.05$). Both groups of ED patients included subjects taking antihypertensive drugs and, as expected, had lower IIEF scores as compared to the Control group (Table 1; $P<0.05$). Moreover, higher fasting glucose levels were found in the ED/DM group as compared with the other groups, and 61% and 8% of ED/DM patients were users of oral hypoglycemics and insulin, respectively (Table 1).

To evaluate oxidative stress status, we studied two antioxidants markers (FRAP and GSH) and two pro-oxidants markers (TBARS and carbonyl protein). While both groups of ED patients had similar TBARS, and carbonyl protein levels as compared to the Control group ($P>0.05$; Table 1), we found lower levels of FRAP and higher levels of GSH in the ED/DM group compared with the Control group ($P<0.05$; Table 1). We found no significant differences with respect to whole blood nitrite concentrations when the three groups were compared ($P>0.05$; Table 1).

The analysis of the responses to showed a negative correlation between whole blood nitrite concentrations and responsiveness to sildenafil (Δ IIEF %), which was consistently found in both ED and ED/DM groups (both $P < 0.05$; Table 2), or when both groups of patients were combined ($P < 0.05$; Table 2). In addition, we found a negative correlation between FRAP and responsiveness to sildenafil only in the ED/DM group ($P < 0.05$; Table 2). Conversely, no significant correlations were found between the other oxidative stress markers (GSH, carbonyl protein and TBARS) and the responsiveness to sildenafil (all $P > 0.05$; Table 2). Moreover, we found no correlation between whole blood nitrite concentrations or oxidative stress parameters and 5-IIEF scores ($P > 0.05$, Table 3).

Discussion

The main findings of this study were that whole blood nitrite, a relevant marker of endogenous NO formation, is inversely correlated with responsiveness to sildenafil, both in ED and ED/DM groups. Additionally, FRAP correlated inversely with responsiveness to sildenafil in ED/DM group. To our knowledge, this is the first study to explore the association between markers of NO formation and oxidative stress with responsiveness to sildenafil in patients with ED and ED/DM.

It is widely acknowledged that NO is a very important signaling molecule in erectile physiology²⁹, and impaired NO formation may affect the different stages of penile erection³⁰⁻³². Therefore drugs that activate the NO-cGMP pathway have been used in the therapy of ED, especially PDE-5 inhibitors such as sildenafil. These drugs clearly increase intracellular cGMP levels, thus improving ED^{12,29,33}. Interestingly, while we found no significant differences in whole blood nitrite concentrations, this marker of endogenous NO formation^{34,35} correlated inversely with the responsiveness to sildenafil in both groups of ED patients, and this particular result suggests that the lower the NO bioavailability, the better are the responses to sildenafil, a drug that indirectly

activates the NO-cGMP pathway. This suggestion aligns with previous studies showing that genetic markers affecting endogenous NO formation ^{27,36} may modify the responses to drugs that upregulate the NO-cGMP pathway ^{19,37,38}, including sildenafil ³⁹. Together, these findings suggest that patients with biochemical profiles particularly depicting impaired endogenous NO formation will benefit from drugs that target the NO-cGMP pathway. In contrast, we could speculate that patients with markers of endogenous NO formation near normal levels are not be the best candidates to take advantage of such drugs, possibly because other mechanisms could play more relevant roles. However, this possibility remains to be proved.

The only marker of oxidative stress that was found in association with responsiveness to sildenafil in ED/DM patients was FRAP. ED patients that are diabetic usually are exposed to increased oxidative stress conditions and have more clear endothelial dysfunction than those ED patients without comorbidities^{8,10}. This may explain why we found worse antioxidant status (lower FRAP) in the ED/DM group. Interestingly, FRAP correlated negatively with responsiveness to sildenafil, and it is possible that antioxidant effects exerted by sildenafil ⁴⁰⁻⁴² may have contributed to this effect. In fact, antioxidant effects exerted by sildenafil may increase NO activity, thus potentiating the responses to sildenafil. It is not clear why this inverse relationship was not found in the ED group. However, it is possible that oxidative stress is more relevant in the ED/DM group than in the ED group, even though we found no significant differences in markers of oxidative stress between the ED and the ED/DM group.

Important limitations of the present study should be taken into consideration. Patients in the ED and ED/DM groups were taking medications to treat hypertension and DM, and these medications may have affected all biochemical parameters assessed in the present study^{43,44}. While this factor may have obscured possible differences between groups, the main goal of the present study was to assess whether these markers would correlate with responsiveness to

sildenafil, and it is clear from our results that low endogenous NO formation is associated with improved responses to this drug. In addition, we have studied a relatively small number of subjects. However, we found significant negative correlation between whole blood nitrite and responsiveness to sildenafil in both groups of ED patients (with and without EM), and this finding is biologically plausible. Finally, we have examined acute responses to sildenafil, and it would be interesting to study the chronic effects of long term therapy with sildenafil ⁴⁵. In conclusion, our findings show that endogenous NO formation correlates negatively with responsiveness to sildenafil in ED and ED/DM patients. Our results may indicate that PDE-5 inhibitors may exert beneficial effects, particularly in patients with impaired NO formation, with better therapeutic responses that may not be limited to ED and extend to their cardiovascular system as a whole.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

References

1. Schwartz BG, Kloner RA. How to save a life during a clinic visit for erectile dysfunction by modifying cardiovascular risk factors. *Int J Impot Res* 2009; **21**(6): 327-335.
2. De Young L, Yu D, Bateman RM, Brock GB. Oxidative stress and antioxidant therapy: their impact in diabetes-associated erectile dysfunction. *J Androl* 2004; **25**(5): 830-836.
3. Jensen J, Lendorf A, Stimpel H, Frost J, Ibsen H, Rosenkilde P. The prevalence and etiology of impotence in 101 male hypertensive outpatients. *Am J Hypertens* 1999; **12**(3): 271-275.

4. Benet AE, Melman A. The epidemiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 1995; **22**(4): 699-709.
5. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* **459**(6): 923-939.
6. Jones RW, Rees RW, Minhas S, Ralph D, Persad RA, Jeremy JY. Oxygen free radicals and the penis. *Expert Opin Pharmacother* 2002; **3**(7): 889-897.
7. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; **257**(5068): 401-403.
8. Agarwal A, Nandipati KC, Sharma RK, Zippe CD, Raina R. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl* 2006; **27**(3): 335-347.
9. Vicari E, La Vignera S, Condorelli R, Calogero AE. Endothelial antioxidant administration ameliorates the erectile response to PDE5 regardless of the extension of the atherosclerotic process. *J Sex Med* **7**(3): 1247-1253.
10. Guay AT. Sexual dysfunction in the diabetic patient. *Int J Impot Res* 2001; **13 Suppl 5**: S47-50.
11. Thorve VS, Kshirsagar AD, Vyawahare NS, Joshi VS, Ingale KG, Mohite RJ. Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management. *J Diabetes Complications* **25**(2): 129-136.
12. Sandner P, Hutter J, Tinel H, Ziegelbauer K, Bischoff E. PDE5 inhibitors beyond erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2007; **19**(6): 533-543.
13. Eardley I, Donatucci C, Corbin J, El-Meliegy A, Hatzimouratidis K, McVary K *et al.* Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *J Sex Med* 2010; **7**(1 Pt 2): 524-540.
14. Corbin JD, Francis SH, Webb DJ. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology* 2002; **60**(2 Suppl 2): 4-11.
15. Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. *N Engl J Med* 1998; **338**(20): 1397-1404.
16. Padma-Nathan H, Steers WD, Wicker PA. Efficacy and safety of oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study of 329 patients. Sildenafil Study Group. *Int J Clin Pract* 1998; **52**(6): 375-379.
17. Angulo J, Gonzalez-Corrochano R, Cuevas P, Fernandez A, La Fuente JM, Rolo F *et al.* Diabetes exacerbates the functional deficiency of NO/cGMP pathway associated with erectile dysfunction in human corpus cavernosum and penile arteries. *J Sex Med* **7**(2 Pt 1): 758-768.

18. de Tejada IS. Therapeutic strategies for optimizing PDE-5 inhibitor therapy in patients with erectile dysfunction considered difficult or challenging to treat. *Int J Impot Res* 2004; **16 Suppl 1**: S40-42.
19. Nagasaki S, Sertorio JT, Metzger IF, Bem AF, Rocha JB, Tanus-Santos JE. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med* 2006; **41**(7): 1044-1049.
20. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; **186**: 464-478.
21. Bird RP, Draper HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 299-305.
22. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; **233**: 380-385.
23. Rosen RC, Riley A, Wagner G, Osterloh IH, Kirkpatrick J, Mishra A. The international index of erectile function (IIEF): a multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction. *Urology* 1997; **49**(6): 822-830.
24. Cappelleri JC, Rosen RC, Smith MD, Mishra A, Osterloh IH. Diagnostic evaluation of the erectile function domain of the International Index of Erectile Function. *Urology* 1999; **54**(2): 346-351.
25. Metzger IF, Ishizawa MH, Rios-Santos F, Carvalho WA, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects. *Pharmacogenomics J* 2011; **11**(6): 393-399.
26. Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Relationship between systemic nitric oxide metabolites and cyclic GMP in healthy male volunteers. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; **188**(2): 123-127.
27. Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med* 2007; **43**(6): 987-992.
28. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; **239**(1): 70-76.
29. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther* 2005; **106**(2): 233-266.
30. McVary KT. Clinical practice. Erectile dysfunction. *N Engl J Med* 2007; **357**(24): 2472-2481.

31. Awad A, Alsaïd B, Bessede T, Droupy S, Benoit G. Evolution in the concept of erection anatomy. *Surg Radiol Anat* 2011; **33**(4): 301-312.
32. Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. *J Androl* 2003; **24**(6 Suppl): S17-37.
33. Carson CC, Lue TF. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *BJU Int* 2005; **96**(3): 257-280.
34. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res* 1999; **41**(3): 765-772.
35. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M *et al.* Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(22): 12814-12819.
36. Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagasaki S, Desta Z, Flockhart DA *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet Genomics* 2005; **15**(8): 565-570.
37. Nagasaki S, Herculano RD, Graeff CF, Tanus-Santos JE. eNOS T-786C polymorphism affects atorvastatin-induced changes in erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; **65**(4): 385-392.
38. Lacchini R, Silva PS, Tanus-Santos JE. A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; **106**(5): 357-361.
39. Muniz JJ, Lacchini R, Rinaldi TO, Nobre YT, Cologna AJ, Martins AC *et al.* Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. *Pharmacogenomics J* 2012.
40. Dias-Junior CA, Neto-Neves EM, Montenegro MF, Tanus-Santos JE. Hemodynamic effects of inducible nitric oxide synthase inhibition combined with sildenafil during acute pulmonary embolism. *Nitric Oxide* 2010; **23**(4): 284-288.
41. Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T, da Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2005; **101**(1): 115-120, table of contents.
42. Neto-Neves EM, Dias-Junior CA, Uzuelli JA, Pereira RP, Spiller F, Czaikoski PG *et al.* Sildenafil improves the beneficial hemodynamic effects exerted by atorvastatin during acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 2011; **670**(2-3): 554-560.

43. Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, Montenegro MF, Fontana V, Salgado MC *et al.* Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 2010; **160**(1): 77-87.
44. Martinez ML, Rizzi E, Castro MM, Fernandes K, Bendhack LM, Gerlach RF *et al.* Lercanidipine decreases vascular matrix metalloproteinase-2 activity and protects against vascular dysfunction in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2008; **599**(1-3): 110-116.
45. Burnett AL, Strong TD, Trock BJ, Jin L, Bivalacqua TJ, Musicki B. Serum biomarker measurements of endothelial function and oxidative stress after daily dosing of sildenafil in type 2 diabetic men with erectile dysfunction. *J Urol* 2009; **181**(1): 245-251.

Tables
Table 1

Clinical and laboratory characteristics of study participants

	Controls	ED	ED/DM
<i>N</i>	28	26	18
Age (years)	54.4 ± 6.4	55.8 ± 13.4	56.9 ± 9.0
Ethnicity (white/non-white)	57/43	46/54	46/54
Waist circumference (cm)	95.0 ± 10.0	100.9 ± 13.1	103.7 ± 11.6
BMI (Kg/m ²)	26.4 ± 4.1	28.4 ± 5.3	28.9 ± 4.5
Smoking (%)			
No smoker	14	19	15
Current smoker	86	81	85
SAP (mmHg)	127.8 ± 17.1	132.8 ± 15.2	136.7 ± 11.1
DAP (mmHg)	80.6 ± 9.3	83.9 ± 7.0	82.7 ± 5.2
HDL (mg/dL)	34.0 ± 9.8	38.8 ± 7.2	41.7 ± 10.0
LDL (mg/dL)	130.9 ± 40.5	116.6 ± 31.4	112.1 ± 29.0
Total cholesterol (mg/dL)	167.3 ± 37.2	177.7 ± 34.8	187.9 ± 33.9
Triglycerides (mg/dL)	124.8 ± 49.3	151.4 ± 51.8	135.0 ± 61.3
Fasting glucose (mg/dL)	90.5 ± 16.2	94.8 ± 19.0	171.3 ± 63.5*
Urea (mg/dL)	35.4 ± 6.2	30.9 ± 5.7	32.1 ± 8.4
Creatinine (mg/dL)	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.5
Users of antihypertensive (%)	0	35*	56*
Users of oral hypoglycemics (%)	0	0	61*
Users of insulin (%)	0	0	8*
IIEF score			
EF	28.1 ± 1.7	9.6 ± 6.6*	8.7 ± 6.2*
OF	9.7 ± 0.6	7.6 ± 3.1*	6.8 ± 3.8*
SD	7.4 ± 1.4	5.8 ± 2.2*	6.5 ± 2.3
IS	10.5 ± 4.2	4.7 ± 4.2*	5.0 ± 4.6*
GS	8.4 ± 2.0	4.3 ± 2.2*	4.3 ± 2.8*
FRAP (μmol/L)	1143.0 ± 227.2	1083.0 ± 189.4	936.0 ± 185.4*
GSH (mmol/L)	398.2 ± 72.5	473.1 ± 136.7	488.6 ± 122.7*
TBARS (mmol/L)	6.2 ± 1.9	6.0 ± 2.1	6.6 ± 2.1
Carbonyl protein (mmol/mg)	1.3 ± 0.6	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.7
Whole blood nitrite (nmol/L)	160.7 ± 82.1	190.1 ± 87.8	184.2 ± 100.6

BMI=body mass index; **SAP**=systolic arterial pressure; **DAP**=diastolic arterial pressure; **HDL**=High-density lipoprotein; **LDL**=Low-density lipoprotein; **IIEF**= International index of erectile function; **EF**=Erectile function; **OF**=Orgasmic function; **SD**=Sexual Desire; **IS**=Intercourse satisfaction; **GS**=Overall satisfaction; **FRAP**=ferric reducing ability of plasma; **GSH**= reduced glutathione; **TBARS**=thiobarbituric acid reactive substances.

Values are expressed as the mean ± s.d. **P*<0.05 versus the control group

Table 2

Spearman's correlation between response to sildenafil and markers of nitric oxide (NO) formation and oxidative stress in patients with erectile dysfunction

Δ IIEF (%)	ED+ED/DM (n=44)		ED (n=26)		ED/DM (n=18)	
	<i>rs</i>	<i>P</i>	<i>rs</i>	<i>P</i>	<i>rs</i>	<i>P</i>
Whole blood nitrite (nmol/L)	- 0.4682	0.0014*	- 0.4201	0.0326*	- 0.5613	0.0154*
FRAP (umol/L)	- 0.2270	0.1383	- 0.1247	0.5438	- 0.4825	0.0426*
GSH (mmol/L)	0.0437	0.7806	- 0.0015	0.9941	0.1388	0.5830
Carbonyl protein (mmol/mg)	- 0.0166	0.9148	0.0246	0.9048	- 0.0368	0.8848
TBARS (umol/L)	- 0.0835	0.5897	- 0.1700	0.4065	0.1227	0.6276

Δ IIEF(%)=Percentage change of five-item version of International Index for Erectile Function; **FRAP**=ferric reducing ability of plasma; **GSH**=reduced glutathione; **TBARS**=thiobarbituric acid reactive substances.

* $P < 0.05$ (spearman correlation, *rs*)

Table 3

Spearman's correlation between degree of erectile dysfunction and markers of nitric oxide (NO) formation and oxidative stress in patients with erectile dysfunction

5-IIEF	ED+ED/DM (n=44)		ED (n=26)		ED/DM (n=18)	
	<i>rs</i>	<i>P</i>	<i>rs</i>	<i>P</i>	<i>rs</i>	<i>P</i>
Whole blood nitrite (nmol/L)	0.1404	0.3633	0.0237	0.9086	0.3138	0.2048
FRAP (umol/L)	0.0685	0.6587	- 0.0951	0.6440	0.3553	0.1479
GSH (mmol/L)	- 0.0006	0.9969	- 0.0355	0.8660	0.0197	0.9380
Carbonyl protein (mmol/mg)	0.1340	0.3857	0.0515	0.8027	0.3366	0.1720
TBARS (umol/L)	- 0.0812	0.5976	- 0.1307	0.5246	0.0104	0.9673

5-IIEF=five-item version of International Index for Erectile Function; **FRAP**=ferric reducing ability of plasma; **GSH**=reduced glutathione; **TBARS**=thiobarbituric acid reactive substances.

4 – DISCUSSÃO

O sildenafil mantém-se há vários anos como o tratamento via oral mais utilizado para o tratamento de DE independente de sua etiologia [57], porém nem todos pacientes respondem ao tratamento com esse iPDE-5 da mesma maneira, sendo necessários estudos que esclareçam essa diferença na resposta. Desta maneira, esse trabalho foi realizado para avaliar se marcadores bioquímicos e genéticos poderiam se associar a resposta ao sildenafil em pacientes com DE. Para realizar tais avaliações, este trabalho foi dividido em dois estudos, estudo 1 em que foram analisadas a associação de marcadores genéticos e a resposta ao sildenafil e estudo 2 em que foram avaliadas as correlações de marcadores bioquímicos e resposta ao sildenafil, ambos em pacientes com DE.

Os principais achados dos dois estudos foram: (a) Diferentes polimorfismos no gene da eNOS afetam a resposta ao sildenafil em pacientes com DE pós operatória (prostatectomia radical) e DE clínica; (b) Haplótipos da eNOS afetam a resposta ao sildenafil em pacientes com DE pós operatória; (c) Baixos níveis de NO são correlacionados a melhor resposta ao sildenafil em pacientes com DE clínica. Este foi o primeiro trabalho que mostra a relação de marcadores bioquímicos e genéticos com a resposta ao sildenafil em pacientes com DE.

Em ambos os estudos a DE foi diagnosticada por avaliação clínica realizada por um urologista. Ao serem recrutados para o estudo, os participantes foram submetidos a um questionário para avaliar a função erétil: o quinto domínio do Índice Internacional de Função Erétil (IIEF-5). O IIEF é um questionário que vem sendo amplamente utilizado para diagnóstico complementar de DE, para avaliar o

grau da doença e também para avaliar a resposta ao tratamento de DE. É um questionário dividido em 5 domínios: função erétil (FE ou IIEF-5), função orgásmica, desejo sexual, satisfação no intercurso, satisfação geral. O domínio função erétil, ou quinto domínio (IIEF-5), é composto por 6 perguntas e foi utilizado neste trabalho e em demais estudos para avaliar a função erétil e a resposta ao sildenafil nos participantes. A pontuação do IIEF-5 pode variar de 1 a 30, sendo que homens com IIEF-5 ≥ 26 são considerados com função erétil normal, enquanto que aqueles que obtêm um IIEF-5 < 26 são considerados com algum grau de DE [58, 59]. De acordo com o IIEF-5 a severidade da DE é classificada em 5 estágios: sem DE (FE de 26 a 30); DE leve (FE de 22 a 25); DE leve a moderada (FE de 17 a 21); DE moderada (FE de 11 a 16); DE severa (FE de 1 a 10) [60]. Neste trabalho pacientes com DE pós operatória foram mais frequentes no grupo dos que não mudaram de estágio de DE após o uso do sildenafil, comparados aos pacientes com DE clínica [Anexos. Pag. 82. Figura 1(A)]. Da mesma maneira, entre os dois subgrupos de DE clínica selecionados para o segundo estudo, os pacientes com DE e DM (grupo DE/DM) foram mais frequentes no grupo que não mudou de estágio de DE [Anexos. Pag. 82. Figura 1(B)], mostrando assim que a magnitude da resposta ao tratamento com sildenafil pode variar de acordo com a fisiopatologia e comorbidades da DE.

Pacientes com DE que utilizaram sildenafil no mínimo 8 vezes, na dose de 50 ou 100mg, segundo critério médico, responderam ao IIEF-5 antes e após o início do uso desse iPDE-5. A determinação da resposta ao sildenafil foi realizada de acordo com a porcentagem da diferença na pontuação obtida após o uso do

sildenafil (IIEF pós sildenafil) subtraída da pontuação obtida antes do uso do sildenafil (IIEF pré sildenafil), obtendo então o delta percentual de resposta ao sildenafil [Δ IIEF-5 (%)].

No primeiro estudo avaliamos se marcadores genéticos afetam a resposta ao sildenafil. Para isso selecionamos 118 homens com diagnóstico médico de DE, separados em dois grupos: 55 homens com DE clínica ou orgânica, que tinham DE por motivos como DM entre outros; 63 pacientes com DE pós-operatória, consequente à prostatectomia radical. A prostatectomia é o tratamento de escolha do câncer de próstata localizado, sendo que uma de suas possíveis consequências é a DE, devido principalmente a possibilidade de lesão de nervos cavernosos durante o processo cirúrgico, entre outros fatores intrínsecos à essa cirurgia que podem prejudicar a ereção peniana [2, 14]. Sendo assim a DE causada por prostatectomia radical seria fundamentalmente de ordem neurogênica. Por outro lado, a DE clínica ou cirúrgica, causada por DM entre outros tem como causa fundamental a disfunção endotelial [61]. Os pacientes foram separados nesses dois grupos, pois a etiologia de base da DE pode alterar a resposta ao tratamento dessa doença.

Neste primeiro estudo os pacientes foram separados em bons respondedores (BR) e maus respondedores (MR) ao sildenafil de acordo com seus valores de Δ IIEF-5(%). Pacientes com Δ IIEF-5(%) maior que a mediana do seu grupo foram considerados BR, enquanto que aqueles com Δ IIEF-5(%) menor

que a mediana do seu grupo foram considerados MR. Além disso, pacientes com Δ IIEF-5(%) na mediana não foram considerados para as análises subsequentes.

Como já mencionado, o NO é de fundamental importância para a ereção peniana [1] e seus níveis podem ser afetados por alguns fatores, entre eles polimorfismos no gene da isoforma eNOS, uma das responsáveis pela produção do NO que age no mecanismo de ereção.

No presente estudo encontramos que pacientes com DE pós-operatória portadores do alelo C são mais frequentes no grupo de BR comparados aos MR ao sildenafil. O genótipo CC do SNP T⁻⁷⁸⁶C na região promotora da eNOS, associado em estudos anteriores a uma menor taxa transcricional de RNAm de eNOS [45] e menores níveis de NO plaquetário [19], foi associado também com DE [22, 23], além de outras doenças como a hipertensão [36]. Além disso, células endoteliais com o genótipo CC responderam melhor a fluvastatina comparadas as portadoras do genótipo TT, apresentando maiores níveis de RNAm para eNOS [62]. Nagasaki e colaboradores (2006) mostraram que indivíduos saudáveis e com genótipo CC respondem melhor a atorvastatina, resposta medida pelo aumento dos níveis de nitrito no sangue total [63]. Silva e colaboradores (2012) mostraram recentemente que pacientes hipertensos portadores do alelo C respondem melhor ao enalapril usado como terapia anti-hipertensiva [64]. Portanto, o alelo C do SNP T⁻⁷⁸⁶C da região promotora da eNOS, que já foi mostrado ser associado a menores níveis de NO, levar à suscetibilidade à DE e outras doenças, e melhorar a resposta ao enalapril e estatinas, foi associado no

presente estudo à melhor resposta ao sildenafil em pacientes com DE pós-operatória.

Quanto ao polimorfismo no intron 4, neste estudo observamos que pacientes com DE clínica portadores do alelo 4a responderam melhor ao sildenafil comparados aos portadores do alelo 4b. Como já foi mencionado, na presença do alelo 4b há maior produção de um pequeno RNA de interferência [46, 47], o que poderia causar uma menor produção de NO nos portadores do alelo 4b. Apesar de sua implicação funcional, o VNTR no intron 4 não foi associado à DE em estudos anteriores. Porém, Peskircioglu e colaboradores (2007) mostraram que a presença do alelo 4a foi associada a melhor resposta ao sildenafil comparado ao alelo 4b em pacientes com DE independente da etiologia [56], o que reflete os resultados que encontramos no grupo de DE clínica, mas não no grupo com DE pós-operatória. O fato de diferentes polimorfismos afetarem a resposta ao sildenafil nos dois grupos de DE fortalece a hipótese que a fisiopatologia das doenças influencie na resposta ao tratamento desta doença.

O terceiro polimorfismo do gene da eNOS aqui estudado foi o SNP no exon 7, que pela substituição de uma guanina por uma timina na posição 894 do gene (G894T) leva a substituição de um glutamato por aspartato no resíduo 298 da proteína (Glu298Asp). Estudos funcionais mostram que a presença do alelo Asp leva a uma menor disponibilidade de eNOS na cavéola e consequente ligação à caveolina, processo esse fundamental para a atividade da eNOS [50]. No presente estudo, observamos no grupo de pacientes com DE pós-operatória que MR ao

sildenafil tiveram uma frequência maior do genótipo GluAsp comparado ao GluGlu. Da mesma maneira que para os outros dois polimorfismos da eNOS já citados, essa diferença foi observada somente em um dos grupos de DE, no grupo DE pós operatória. Além do mais, como não encontramos associação de alelo com a resposta ao sildenafil, não sabemos qual deles está relacionado à melhor ou pior resposta ao sildenafil nesses pacientes. Por outro lado, Eisenhardt e colaboradores (2003) mostraram que pacientes portadores do genótipo GluGlu, com DE e comorbidades cardiovasculares apresentaram melhor resposta ao sildenafil comparados a outros genótipos [55], o que não foi visto quando somente os pacientes com DE sem comorbidades cardiovasculares foram avaliados.

Como já foi mencionado, a análise de haplótipos é uma abordagem melhor comparada a avaliação de polimorfismos isolados. Esse trabalho é o primeiro a avaliar haplótipos de eNOS com relação a resposta ao sildenafil em pacientes com DE. Observamos que portadores do haplótipo formado pela combinação dos alelos C 4a Glu (H6) foram mais frequentes no grupo de indivíduos BR aos MR ao sildenafil. Essa diferença foi observada somente no grupo de indivíduos com DE pós operatória. Além do mais, nesse grupo observamos que o haplótipo composto pelos alelos T 4b Asp (H3) parece ser mais comum em MR comparados a BR ao sildenafil, porém essa diferença significativa não permaneceu após corrigirmos a análise para os seis possíveis haplótipos (correção de Bonferroni). Da mesma maneira que para os resultados dos polimorfismos analisados separadamente, nessa análise não observamos os mesmos resultados nos dois grupos de DE:

clínica e pós-operatória. Interessantemente, observamos que os haplótipos mais frequentes em BR e MR não compartilham nenhum de seus alelos.

Esse estudo tem como principais achados: (a) em pacientes com DE pós-operatória: o alelo C para o polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C na região promotora e o haplótipo C 4a Glu estão associados com melhor resposta ao sildenafil; (b) em pacientes com DE clínica: o alelo 4a para o polimorfismo 4b4a no intron 4 da eNOS está associado a melhor resposta ao sildenafil; (c) o genótipo GluAsp tem uma pequena participação na resposta ao sildenafil em pacientes com DE pós-operatória.

Os resultados do estudo 1 podem contribuir para perspectivas de tratamentos diferenciados a pacientes com DE maus respondedores ao sildenafil. Porém, vários fatores como comorbidades e uso de medicamentos podem sabidamente influenciar na suscetibilidade da DE e resposta ao seu tratamento. Dessa maneira, avaliamos também nesse estudo a influência dos medicamentos na resposta ao sildenafil nos dois grupos de DE. Foi observado que hipoglicemiantes orais, β -bloqueadores, IECAs (inibidores da enzima conversora de angiotensina), diuréticos tiazídicos, bloqueadores de canais de cálcio, hipocolesterolemiantes orais e antiagregantes plaquetários influenciam na resposta ao sildenafil nos pacientes deste estudo [Anexos. Pag. 83. Figura 2 (A) e 2 (B)]. Algumas classes de fármacos, como os IECAs e hipocolesterolemiantes, influenciaram a resposta ao sildenafil de maneira contrária nos dois grupos de pacientes. Além do mais, classificamos como hipertensos os pacientes que

usavam algum tipo de anti-hipertensivo, assim como diabéticos os pacientes que fazem tratamento para DM. Dessa maneira, não sabemos qual é a real influência dos medicamentos, assim como da doença para a qual o fármaco foi indicado, na resposta ao sildenafil em pacientes com DE.

Além do mais, já foi observado em estudos anteriores que, de acordo com a etnicidade dos participantes, há uma distribuição diferente para genótipos e haplótipos dos polimorfismos da eNOS aqui estudados [43, 65]. Porém no presente estudo, quando comparamos indivíduos brancos e negros (classificados por auto-definição), não observamos diferença na resposta ao sildenafil. (Anexos. Pag. 84. Figura 3).

No segundo estudo aqui apresentado, no qual avaliamos a correlação de marcadores bioquímicos relacionados ao NO e resposta ao sildenafil em pacientes com DE, recrutamos 44 homens com diagnóstico de DE clínica ou orgânica que foram separados em dois subgrupos de acordo com comorbidades: 18 pacientes com DE e DM (grupo DE/DM), e 26 pacientes com DE sem comorbidades (grupo DE). É conhecido que pacientes com DE/DM tem estresse oxidativo mais exacerbado do que pacientes com DE sem DM [12, 13]. Desta maneira, a divisão no grupo de DE clínica foi realizada para testarmos a hipótese do estudo sem possíveis interferentes de diferentes graus de estresse oxidativo. Além do grupo de DE clínica, foram recrutados 28 homens sem DE (grupo controle). Utilizamos neste estudo, marcadores relacionados ao NO para correlacionarmos com a resposta ao sildenafil em pacientes com DE. A função erétil de todos os

participantes deste estudo foi avaliada utilizando o questionário IIEF-5 [59]. Da mesma maneira que para o estudo 1, neste a DE também foi diagnosticada por um urologista. O grau de DE e a resposta ao sildenafil destes pacientes foram avaliados de acordo com a pontuação no IIEF-5 e a porcentagem do Δ IIEF-5, respectivamente.

Quando analisamos as características clínicas destes participantes, observamos que o grupo DE/DM apresentou níveis maiores de glicose de jejum e maior porcentagem de participantes utilizando medicamentos para tratar diabetes comparado ao grupo controle, como era de se esperar. Como era esperado também, os grupos DE e DE/DM apresentaram uma porcentagem maior de pacientes utilizando drogas para o tratamento de hipertensão, comparados ao grupo controle. Diabetes e hipertensão tendem a ocorrer concomitantemente, e são comorbidades comumente associadas à DE [31], sendo assim, esperávamos que nos grupos de pacientes com DE houvesse um maior número de pacientes com hipertensão comparado ao grupo controle, em que um dos critérios de inclusão foi a não utilização de medicamentos. Para as análises da correlação de marcadores bioquímicos com resposta ao sildenafil e grau de severidade de DE, somente os pacientes dos grupos de DE foram considerados. A correlação foi analisada em cada subgrupo de DE clínica individualmente (DE e DE/DM), e também juntando os dois subgrupos de DE clínica (DE+DE/DM).

No presente estudo, a medida de nitrito no sangue total foi utilizada como marcador de formação de NO. As características do NO, gás altamente

lipossolúvel e instável, dificultam sua medida [3]. Assim sendo, a maneira mais comumente utilizada para medir NO é a quantificação de seus principais metabólitos: nitrato e nitrito [66]. A utilização do nitrato plasmático como marcador de formação de NO vem sendo bastante questionada devido a alta concentração basal de nitrato no plasma dificultar pequenas alterações de biodisponibilidade de NO [67] e também pela concentração de nitrato ser influenciada por fatores como sua formação a partir de bactérias na saliva e no intestino [3, 67]. Desta maneira, o nitrito vem sendo utilizado como um melhor marcador da formação de NO endógeno, visto que está relacionado à atividade de NOS [68].

Neste estudo não observamos nenhuma diferença nos níveis de nitrito no sangue total quando comparamos os três grupos (controle, DE e DE/DM), da mesma maneira que não encontramos uma correlação entre os níveis de nitrito e grau de DE nos pacientes. Entretanto, quando analisamos a correlação desse marcador de formação de NO e resposta ao sildenafil [Δ IIEF-5(%)] nos pacientes com DE, observamos que há uma correlação negativa deste com a resposta ao sildenafil nos diferentes grupos analisados. Esse resultado nos mostra que, apesar dos níveis de nitrito no sangue total não diferir entre os grupos de DE e controles saudáveis, quanto menor o nível de nitrito melhor a resposta ao sildenafil em pacientes com DE clínica, com ou sem DM. Sabendo da importância do NO na ereção peniana e DE, esperávamos encontrar uma diferença nos níveis de nitrito entre os grupos doentes e saudáveis e também uma correlação significativa entre o nitrito e o grau de DE. Essa falta de diferença pode ser devida principalmente ao

uso de medicamentos pelos pacientes recrutados para o estudo, que como já foi mencionado, parece interferir na resposta ao sildenafil.

A correlação negativa de nitrito e resposta ao sildenafil pode ser devido a uma dessensibilização da via NO/GMPc na presença de menores níveis de nitrito que levaria a uma melhor ação do sildenafil nesses pacientes [69, 70]. Portanto, apesar do NO ser de fundamental importância para a ereção peniana, quando pacientes tem DE e fazem uso do sildenafil, os melhores beneficiados quanto ao seu efeito são aqueles que apresentam menores níveis de nitrito.

Utilizamos também dois marcadores de estresse oxidativo para correlacionar à resposta ao sildenafil e ao grau de DE: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) [71, 72] e proteínas carboniladas [73]. Como foi visto, esses marcadores não mostraram estar diferentes nos grupos de DE e controle, assim como não se correlacionou à resposta ao sildenafil e nem ao grau de DE. Sabe-se que pacientes com DE clínica, em que geralmente há disfunção endotelial, há um aumento na peroxidação lipídica. O TBARS e proteínas carboniladas são técnicas utilizadas para avaliar a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, respectivamente. Ambas são marcadoras de estresse oxidativo e já se mostraram alteradas em outros estudos comparando pacientes com DE à indivíduos saudáveis [74]. Sendo assim, nesse estudo acreditamos que pelo fato de muito dos pacientes nos 2 grupos de DE estarem usando medicamentos que sabidamente tem efeitos antioxidantes, poderia influenciar

nessas medidas, podendo mascarar alguma diferença nos níveis basais e também na correlação com a resposta ao sildenafil e grau de DE.

Além dos marcadores de estresse oxidativo, utilizamos dois marcadores de atividade antioxidante do plasma para correlacionarmos com a resposta ao sildenafil e grau de DE: glutathiona reduzida (GSH) [75, 76] e potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) [74]. Assim como esperávamos, encontramos menores níveis de FRAP nos pacientes com DE/DM comparado aos controles, porém isso não foi observado quando comparamos o grupo DE ao grupo controle. Acreditamos que assim como o estresse oxidativo, a função antioxidante do grupo DE/DM seja mais exacerbada quando comparada a pacientes com DE sem comorbidades. Por outro lado, níveis de GSH foram maiores no grupo de DE/DM comparado ao grupo controle. Porém, imaginamos que assim como para os marcadores de estresse oxidativo, medicamentos também influenciem nos marcadores antioxidantes plasmáticos. Nos dois grupos de pacientes aqui estudados, existem usuários de medicamentos anti-hipertensivos e hipoglicemiantes. Como já mencionado, algumas classes desses medicamentos têm efeito antioxidante [77, 78] o que poderia afetar as medidas aqui realizadas. Dessa maneira, esses resultados devem ser avaliados levando em consideração as limitações desses grupos de estudos. Similarmente, o efeito de medicamentos utilizados pelos pacientes deste estudo podem ter mascarado correlações significativas dos marcadores antioxidantes aqui estudados e o grau de DE. Ao contrário do GSH que também não se correlacionou significativamente com a resposta ao sildenafil, o FRAP mostrou uma correlação negativa somente

no grupo DE/DM, porém não foi acompanhado por diferença significativa nos outros grupos. A correlação negativa encontrada entre FRAP e resposta ao sildenafil nos sugere que quanto menor o poder antioxidante, e conseqüentemente menos NO disponível, melhor a resposta ao sildenafil em pacientes com DE/DM. Sabe-se que na presença de baixo poder antioxidante e conseqüente aumento do estresse oxidativo, há formação de EROs que na presença de NO pode levar a formação de peroxinitrito, entre outros, piorando assim a ereção peniana e talvez a resposta ao sildenafil. Possivelmente essa correlação foi significativa somente neste grupo, devido ao menor poder antioxidante no grupo de DE estar mais exacerbado quando na presença de outra comorbidade, como o DM.

O estudo 2 traz como principais achados que (a) o nitrito, um marcador de formação de NO, é inversamente correlacionado com resposta ao sildenafil em pacientes com DE clínica, independente da etiologia; (b) o marcador antioxidante FRAP é inversamente correlacionado com resposta ao sildenafil em pacientes com DE e DM; (c) os marcadores de formação de NO e estresse oxidativo não tem correlação com a severidade de DE. Sendo assim, esse estudo contribui de uma maneira geral para a idéia que marcadores bioquímicos relacionados ao NO influenciam na resposta ao sildenafil.

Para sabermos a influência dos polimorfismos e haplótipos da eNOS na concentração de nitrito no sangue total, realizamos testes comparando 43 pacientes com DE clínica que foram selecionados para o estudos 1 e 2. Não encontramos nenhuma associação dos genótipos, alelos e haplótipos dos três

polimorfismos estudados (T⁻⁷⁸⁶C na região promotora, 4b4a no intron 4, Glu298Asp no exon 7 da eNOS) e níveis de nitrito no sangue total. (Anexos. Pag. 85, figura 4. Pag. 86, figura 5). Estudos clínicos anteriores, mostram que níveis de nitrito associam-se somente com haplótipos, e que essa associação é diferente dependendo da população. Por exemplo, em indivíduos saudáveis, o haplótipo composto pelos alelos C 4b Glu foi mostrado diminuir níveis de NOx (nitrito + nitrito) [17] e também de nitrito [20]. Esse mesmo haplótipo foi associado a maiores níveis de NOx em pacientes hipertensos e hipertensos diabéticos [21]. Com base em resultados anteriores e do presente estudo observamos que apesar de polimorfismos no gene da eNOS e também níveis de nitrito influenciarem na resposta ao sildenafil em pacientes com DE, essas duas variáveis devem ser consideradas de maneiras independentes quando analisamos a população de indivíduos com DE selecionados para este estudo.

5 – CONCLUSÃO

Em conclusão, nós encontramos que diferentes polimorfismos no gene da eNOS afetam a resposta ao sildenafil em pacientes com DE pós operatória e clínica, que haplótipos da eNOS afetam a resposta ao sildenafil em pacientes com DE pós operatória e que baixo níveis de NO são correlacionados a melhor resposta ao sildenafil em pacientes com DE clínica. De maneira geral, foi possível concluir a partir dos resultados dos dois estudos aqui apresentados que marcadores genéticos e bioquímicos relacionados ao NO influenciam a resposta ao sildenafil em pacientes com DE.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersson, K.E., *Pharmacology of penile erection*. Pharmacol Rev, 2001. 53(3): p. 417-50.
2. Awad, A., et al., *Evolution in the concept of erection anatomy*. Surg Radiol Anat, 2011. 33(4): p. 301-12.
3. Garcia, X. and F. Stein, *Nitric oxide*. Semin Pediatr Infect Dis, 2006. 17(2): p. 55-7.
4. Toda, N., K. Ayajiki, and T. Okamura, *Nitric oxide and penile erectile function*. Pharmacol Ther, 2005. 106(2): p. 233-66.
5. Mills, T.M., K. Chitale, and R.W. Lewis, *Vasoconstrictors in erectile physiology*. Int J Impot Res, 2001. 13 Suppl 5: p. S29-34.
6. McVary, K.T., *Clinical practice. Erectile dysfunction*. N Engl J Med, 2007. 357(24): p. 2472-81.
7. Feldman, H.A., et al., *Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study*. J Urol, 1994. 151(1): p. 54-61.
8. Fung, M.M., R. Bettencourt, and E. Barrett-Connor, *Heart disease risk factors predict erectile dysfunction 25 years later: the Rancho Bernardo Study*. J Am Coll Cardiol, 2004. 43(8): p. 1405-11.
9. Schwartz, B.G. and R.A. Kloner, *How to save a life during a clinic visit for erectile dysfunction by modifying cardiovascular risk factors*. Int J Impot Res, 2009. 21(6): p. 327-35.
10. Jackson, G., *Treatment of erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease : guide to drug selection*. Drugs, 2004. 64(14): p. 1533-45.
11. Yassin, A.A., F. Saad, and L.J. Gooren, *Metabolic syndrome, testosterone deficiency and erectile dysfunction never come alone*. Andrologia, 2008. 40(4): p. 259-64.
12. Guay, A.T., *Sexual dysfunction in the diabetic patient*. Int J Impot Res, 2001. 13 Suppl 5: p. S47-50.

13. Agarwal, A., et al., *Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction*. J Androl, 2006. 27(3): p. 335-47.
14. Marien, T., A. Sankin, and H. Lepor, *Factors predicting preservation of erectile function in men undergoing open radical retropubic prostatectomy*. J Urol, 2009. 181(4): p. 1817-22.
15. Schulz, E., et al., *Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension*. Antioxid Redox Signal, 2008. 10(6): p. 1115-26.
16. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(1): p. 44-84.
17. Metzger, I.F., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men*. Pharmacogenetics and genomics, 2005. 15: p. 565-70.
18. Tsukada, T., et al., *Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 245(1): p. 190-3.
19. Tanus-Santos, J.E., et al., *Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol*. Pharmacogenetics, 2002. 12(5): p. 407-13.
20. Metzger, I.F., J.T.C. Sertório, and J.E. Tanus-Santos, *Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes*. Free radical biology & medicine, 2007. 43: p. 987-92.
21. Sandrim, V.C., et al., *Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients*. Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society, 2007. 16: p. 348-55.
22. Safarinejad, M.R., et al., *Association of the T-786C, G894T and 4a/4b polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene with vasculogenic erectile dysfunction in Iranian subjects*. BJU international, 2010: p. 1-8.

23. Sinici, I., et al., *T-786C polymorphism in promoter of eNOS gene as genetic risk factor in patients with erectile dysfunction in Turkish population*. Urology, 2010. 75(4): p. 955-60.
24. Erkan, E., et al., *Polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in patients with erectile dysfunction*. The journal of sexual medicine, 2006. 3: p. 69-75; discussion 75-6.
25. Rosas-Vargas, H., et al., *Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism is a risk factor for erectile dysfunction in the Mexican Mestizo population*. J Androl, 2004. 25(5): p. 728-32.
26. Lee, Y.C., et al., *The associations among eNOS G894T gene polymorphism, erectile dysfunction and related risk factors*. BJU Int, 2007. 100(5): p. 1116-20.
27. Lee, Y.C., et al., *The associations among eNOS G894T gene polymorphism, erectile dysfunction, and benign prostate hyperplasia-related lower urinary tract symptoms*. J Sex Med, 2009. 6(11): p. 3158-65.
28. Erol, B., et al., *eNOS gene intron 4 VNTR and exon 7-G894T polymorphisms in Turkish men with erectile dysfunction: a case control study*. The journal of sexual medicine, 2009. 6: p. 1423-9.
29. Wang, J.L., et al., *Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and erectile dysfunction: a meta-analysis*. J Sex Med, 2010. 7(12): p. 3889-98.
30. Hermans, M.P., S.A. Ahn, and M.F. Rousseau, *eNOS [Glu298Asp] polymorphism, erectile function and ocular pressure in type 2 diabetes*. Eur J Clin Invest, 2012. 42(7): p. 729-37.
31. De Young, L., et al., *Oxidative stress and antioxidant therapy: their impact in diabetes-associated erectile dysfunction*. J Androl, 2004. 25(5): p. 830-6.
32. Jin, L. and A.L. Burnett, *NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile dysfunction*. Asian J Androl, 2008. 10(1): p. 6-13.
33. Forstermann, U., *Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease*. Pflugers Arch, 2010. 459(6): p. 923-39.

34. Herman, A., R. Adar, and Z. Rubinstein, *Vascular lesions associated with impotence in diabetic and nondiabetic arterial occlusive disease*. *Diabetes*, 1978. 27(10): p. 975-81.
35. Amaral, L.M., et al., *Maternal iNOS genetic polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy*. *J Hum Hypertens*, 2011.
36. Hyndman, M.E., et al., *The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension*. *Hypertension*, 2002. 39(4): p. 919-22.
37. Napoli, C. and L.J. Ignarro, *Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and carotid artery atherosclerosis*. *J Clin Pathol*, 2007. 60(4): p. 341-4.
38. Sandrim, V.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Atherosclerosis*, 2006. 189: p. 241-6.
39. Sandrim, V.C., et al., *eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia*. *Pharmacogenomics*, 2008. 9(10): p. 1467-73.
40. Saur, D., et al., *Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(6): p. 1662-7.
41. Shimasaki, Y., et al., *Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 31(7): p. 1506-10.
42. Souza-Costa, D.C., et al., *eNOS haplotype associated with hypertension in obese children and adolescents*. *Int J Obes (Lond)*, 2011. 35(3): p. 387-92.
43. Tanus-Santos, J.E., M. Desai, and D.A. Flockhart, *Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants*. *Pharmacogenetics*, 2001. 11(8): p. 719-25.

44. Uwabo, J., et al., *Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese*. Am J Hypertens, 1998. 11(1 Pt 1): p. 125-8.
45. Miyamoto, Y., et al., *Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina*. Hum Mol Genet, 2000. 9(18): p. 2629-37.
46. Zhang, M.X., et al., *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(47): p. 16967-72.
47. Zhang, M.X., et al., *Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression*. Mol Biol Cell, 2008. 19(9): p. 3997-4005.
48. Meluzin, J., et al., *Association of coronary artery disease, erectile dysfunction, and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms*. Heart Vessels, 2009. 24(3): p. 157-63.
49. Park, J.K., et al., *Gene-polymorphisms of angiotensin converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase in patients with erectile dysfunction*. Int J Impot Res, 1999. 11(5): p. 273-6.
50. Joshi, M.S., et al., *Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear*. FASEB J, 2007. 21(11): p. 2655-63.
51. Crawford, D.C. and D.A. Nickerson, *Definition and clinical importance of haplotypes*. Annu Rev Med, 2005. 56: p. 303-20.
52. Goldstein, I., et al., *Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction*. Sildenafil Study Group. N Engl J Med, 1998. 338(20): p. 1397-404.
53. Eardley, I., *New oral therapies for the treatment of erectile dysfunction*. Br J Urol, 1998. 81(1): p. 122-7.
54. Jeremy, J.Y., et al., *Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus cavernosum in vitro*. Br J Urol, 1997. 79(6): p. 958-63.

55. Eisenhardt, A., et al., *ACE gene I/D and NOS3 G894T polymorphisms and response to sildenafil in men with erectile dysfunction*. Urology, 2003. 62(1): p. 152-7.
56. Peskircioglu, L., et al., *The association between intron 4 VNTR, E298A and IVF 23+10 G/T polymorphisms of ecNOS gene and sildenafil responsiveness in patients with erectile dysfunction*. Int J Impot Res, 2007. 19(2): p. 149-53.
57. Ghofrani, H.A., I.H. Osterloh, and F. Grimminger, *Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond*. Nat Rev Drug Discov, 2006. 5(8): p. 689-702.
58. Muniz, J.J., et al., *Circulating matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in patients with erectile dysfunction*. Int J Impot Res, 2012. 24(1): p. 38-43.
59. Rosen, R.C., et al., *The international index of erectile function (IIEF): a multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction*. Urology, 1997. 49(6): p. 822-30.
60. Cappelleri, J.C., et al., *Diagnostic evaluation of the erectile function domain of the International Index of Erectile Function*. Urology, 1999. 54(2): p. 346-51.
61. Solomon, H., J.W. Man, and G. Jackson, *Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator*. Heart, 2003. 89(3): p. 251-3.
62. Abe, K., et al., *Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism*. Pharmacogenet Genomics, 2005. 15(5): p. 329-36.
63. Nagasaki, S., et al., *eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite*. Free Radic Biol Med, 2006. 41(7): p. 1044-9.
64. Silva, P.S., et al., *eNOS and BDKRB2 genotypes affect the antihypertensive responses to enalapril*. Eur J Clin Pharmacol, 2012.

65. Marroni, A.S., et al., *Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms*. Nitric Oxide, 2005. 12(3): p. 177-82.
66. Ellis, G., et al., *Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective*. Clin Biochem, 1998. 31(4): p. 195-220.
67. Lauer, T., P. Kleinbongard, and M. Kelm, *Indexes of NO bioavailability in human blood*. News Physiol Sci, 2002. 17: p. 251-5.
68. Kelm, M., et al., *Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway*. Cardiovasc Res, 1999. 41(3): p. 765-72.
69. Halvey, E.J., et al., *Mechanisms of activity-dependent plasticity in cellular nitric oxide-cGMP signaling*. J Biol Chem, 2009. 284(38): p. 25630-41.
70. Ring, A., et al., *Exogenous nitric oxide donation causes desensitization of arteriolar relaxing activity in vivo: an intravital analysis in mice*. J Surg Res, 2010. 164(1): p. 169-74.
71. Atmaca, G., *Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids*. Yonsei Med J, 2004. 45(5): p. 776-88.
72. Bird, R.P. and H.H. Draper, *Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination*. Methods Enzymol, 1984. 105: p. 299-305.
73. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol, 1990. 186: p. 464-78.
74. Aldemir, M., et al., *Evaluation of serum oxidative and antioxidative status in patients with erectile dysfunction*. Andrologia, 2012.
75. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys, 1959. 82(1): p. 70-7.
76. Hu, M.L., *Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma*. Methods Enzymol, 1994. 233: p. 380-5.
77. Ceron, C.S., et al., *Spirolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and*

- expression in a model of renovascular hypertension. Br J Pharmacol, 2010. 160(1): p. 77-87.*
78. Martinez, M.L., et al., *Lercanidipine decreases vascular matrix metalloproteinase-2 activity and protects against vascular dysfunction in diabetic rats. Eur J Pharmacol, 2008. 599(1-3): p. 110-6.*

7 - ANEXOS

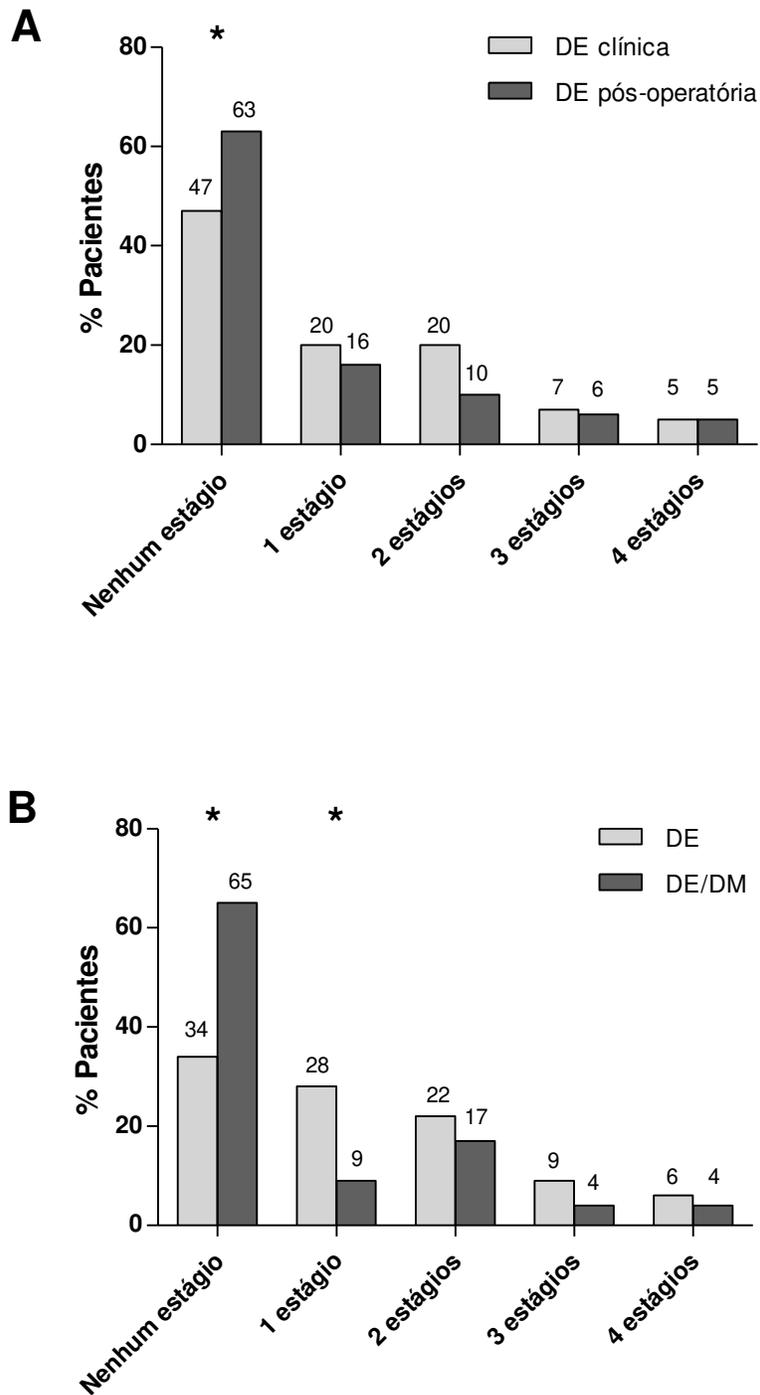


Figura 1 – Mudança de estágio de DE após o uso do sildenafil. **(A)** Pacientes do estudo 1: grupo DE pós operatória e DE clínica. **(B)** Pacientes do estudo 2: grupo DE sem comorbidades e DE com DM (DE e DE/DM, respectivamente). * $P < 0,05$ (Teste do qui-quadrado).

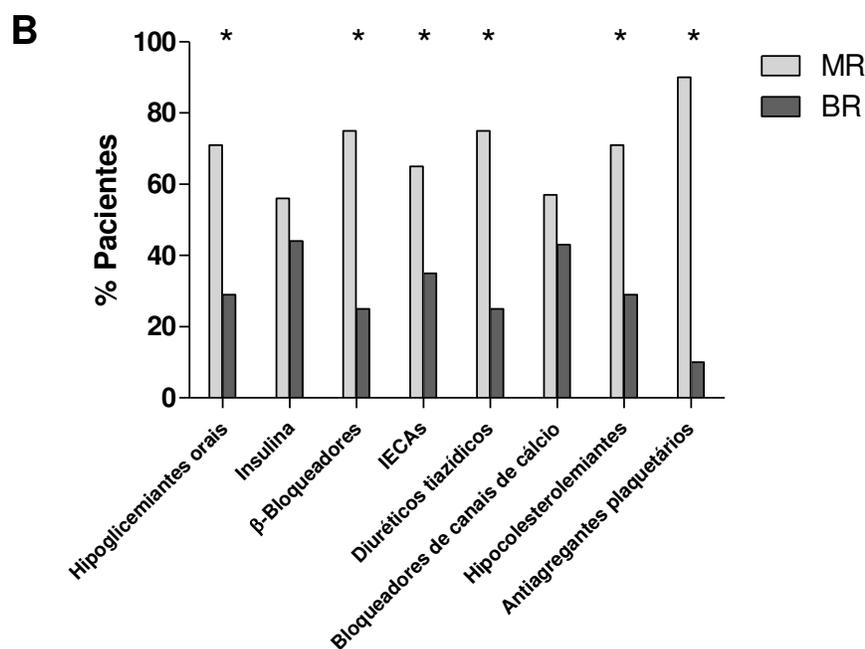
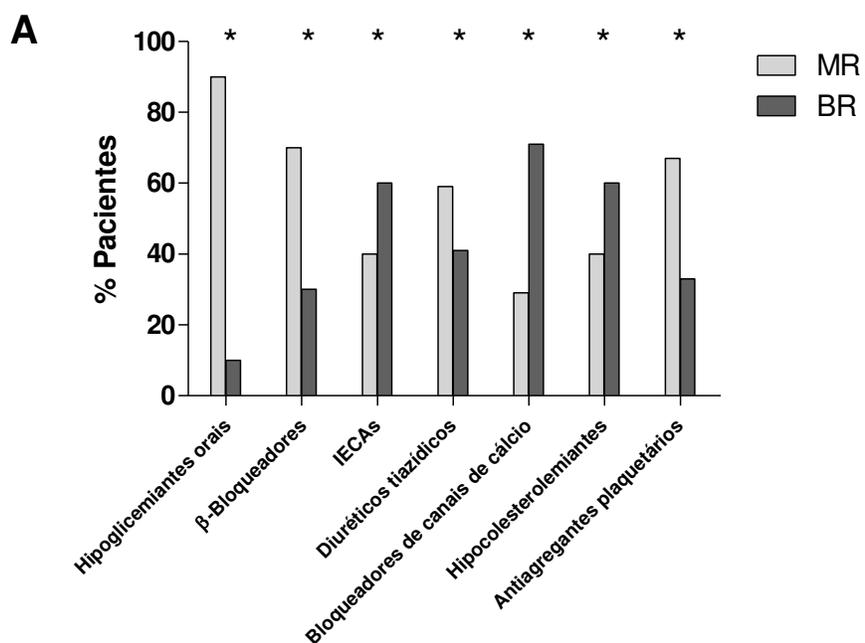


Figura 2 – Influência de medicamentos na resposta ao sildenafil. **(A)** Pacientes com DE pós operatória. **(B)** Pacientes com DE clínica. * $P < 0,05$ (Teste do qui-quadrado).

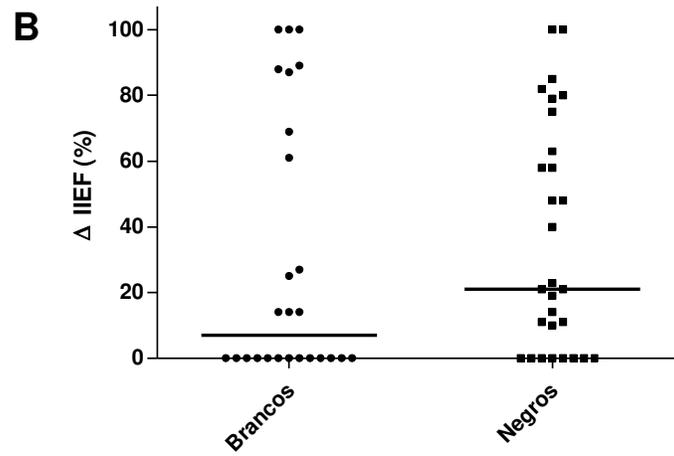
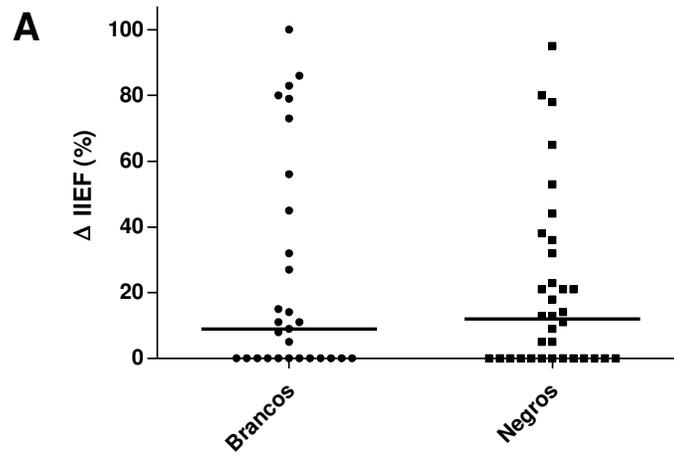


Figura 3 – Diferenças interétnicas e resposta ao sildenafil (Δ IIEF(%)) em pacientes com DE pós operatória (**A**) e DE clínica (**B**). * $P < 0,05$ (Teste *T*).

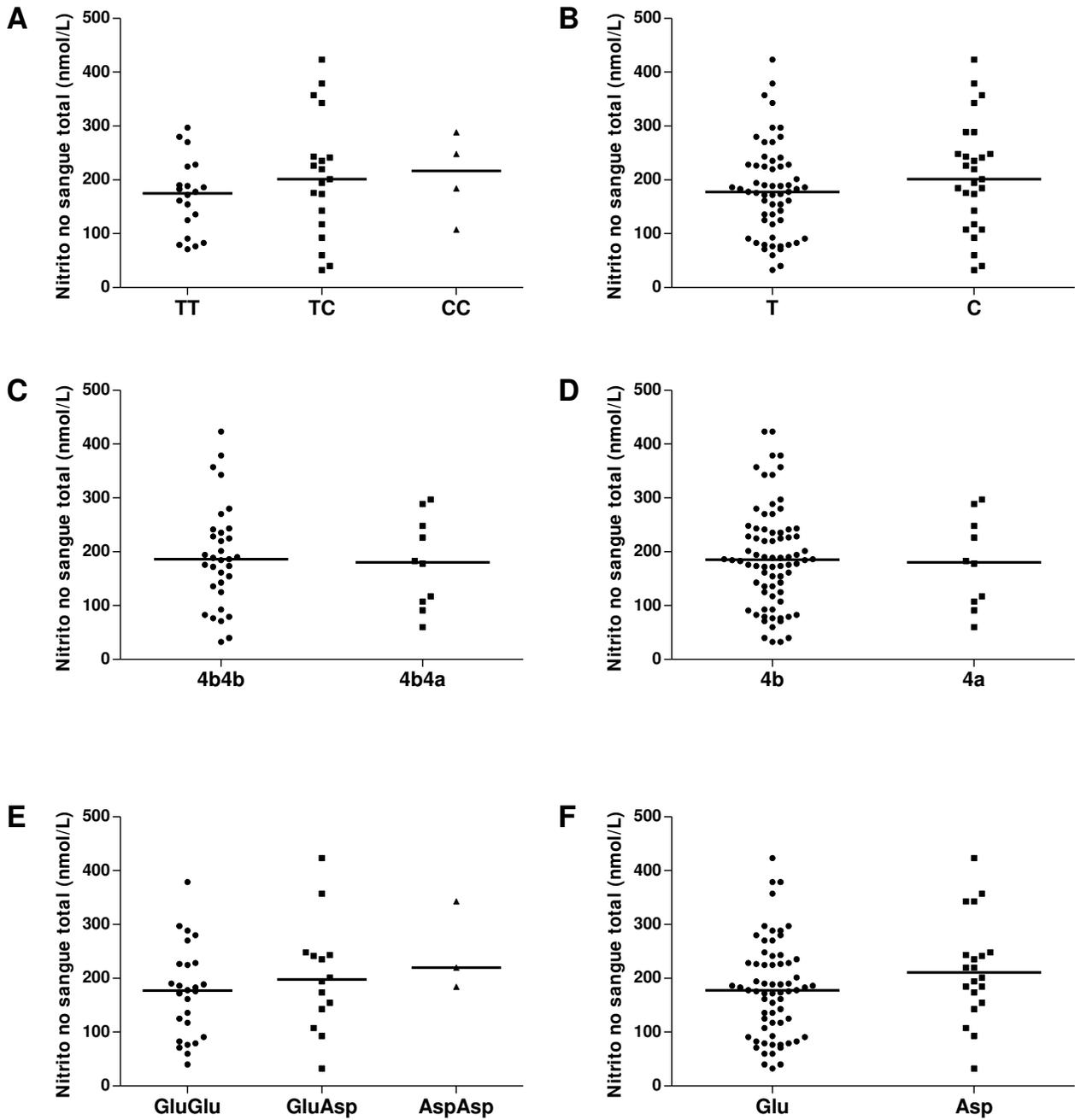


Figura 4 – Níveis de nitrito no sangue total entre os genótipos e alelos dos polimorfismos no gene da eNOS: **(A)(B)** $T^{-786}C$ na região promotora, **(C)(D)** 4b4a no intron 4, **(E)(F)** Glu298Asp no exon 7 gene da eNOS. * $P < 0,05$ (Teste T e *One-way ANOVA*).

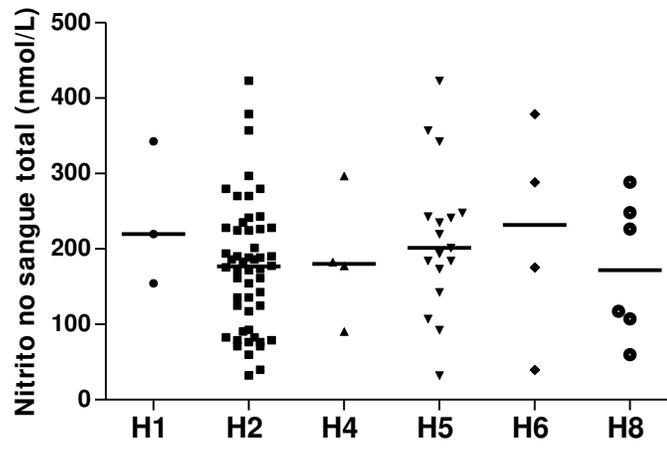


Figura 5 – Níveis de nitrito no sangue total entre haplótipos da eNOS. H1 (T 4b Asp), H2 (T 4b Glu), H4 (T 4a Glu), H5 (C 4b Asp), H6 (C 4b Glu), H8 (C 4a Glu). *P<0,05 (*One-way ANOVA*).



Ribeirão Preto, 23 de junho de 2008

Ofício nº 2244/2008
cep/2008

Prezado Professor,

O trabalho intitulado "**FARMACOGENÉTICA DO TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL: RELEVANCIA DE MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 268ª Reunião Ordinária realizada em 23/06/2008 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5469/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Inicial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,



PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TARUS DOS SANTOS
Depto. de Farmacologia - FMRP-USP

Projeto "Farmacogenética do tratamento da disfunção erétil: Relevância de marcadores genéticos e bioquímicos"

Índice Internacional de Função Erétil (IIEF)

Número do Prontuário HC _____ Data: _____
 Score IIEF: FE(1,2,3,4,5,15) pré _____ pós _____ FO(9,10) _____ DS (11,12) _____ SI(6,7,8) _____ SG(13,14) _____

1. Nas últimas quatro semanas, com que frequência você foi capaz de ter uma ereção durante uma relação sexual?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Sem atividade sexual <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase sempre ou sempre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 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?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Sem estimulação sexual <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase sempre ou sempre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase nunca ou nunca
3. Nas últimas quatro semanas, quando você tentou ter relação sexual com que frequência foi capaz de penetrar (entrar) na sua parceira?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Não tentei ter relação sexual <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase sempre ou sempre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase nunca ou nunca
4. Nas últimas quatro semanas, durante uma relação sexual com que frequência você foi capaz de manter sua ereção após ter penetrado (entrado) na sua parceira?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Não tentei ter relação sexual <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase sempre ou sempre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase nunca ou nunca
5. Nas últimas quatro semanas, durante uma relação sexual, o quanto foi difícil para você manter sua ereção até o fim da relação?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Não tentei ter relação sexual <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Extremamente difícil <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Muito difícil <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Difícil <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Pouco difícil <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Não difícil
6. Nas últimas quatro semanas, quantas vezes você tentou ter relação sexual?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Não tentou <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-2 tentativas <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 3-4 tentativas <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 5-6 tentativas <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 7-10 tentativas <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 11 ou mais tentativas
7. Nas últimas quatro semanas, quando você tentou ter relação sexual com que frequência ela foi satisfatória para você?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Não tentei ter relação sexual <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase sempre ou sempre <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> A maioria das vezes (muito mais que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Algumas vezes (aproximadamente a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Poucas vezes (muito menos que a metade das vezes) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Quase nunca ou nunca

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



DECLARAÇÃO

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada "Resposta ao sildenafil em pacientes com disfunção erétil: estudo de marcadores genéticos e bioquímicos relacionados ao óxido nítrico", não infringem os dispositivos da Lei nº9. 610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30/05/2012

Autor (a) Jaqueline Joice Muniz

RG nº. 13837203 SSP/MG

Orientador (a) Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

RG nº. 5022887326 SSP/RS