



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOINGENIERÍA**

**RELEVANCIA FUNCIONAL DE LOS  
POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA *ENZIMA ÓXIDO  
NÍTRICO SINTETASA ENDOTELIAL (eNOS)* Y  
microRNA CIRCULANTES EN PACIENTES CON  
CARDIOPATÍA ISQUÉMICA Y DISFUNCIÓN  
ERÉCTIL**

**ANA MARÍA SEGURA PAÑOS**

DIRECTORA  
**DRA. ANA MARÍA PEIRÓ PEIRÓ**

CODIRECTOR  
**DR. THOMAS ZANDONAI**

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**ALICANTE. 2024**





La Dra. Dña. Ana María Peiró Peiró, profesora titular del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Facultad de Medicina y profesora del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, directora de la tesis doctoral

INFORMA:

Que Dña Ana María Segura Paños, ha realizado bajo mi supervisión el trabajo titulado “**Relevancia funcional de los polimorfismos del gen de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y microRNA circulantes, en pacientes con cardiopatía isquémica y disfunción eréctil**”, conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Alicante a 6 de abril de 2024.

Dra. Dña. Ana María Peiró Peiró

Directora de la tesis





El Dr Thomas Zandonai, investigador postdoctoral del Departamento de Psicología y Ciencias Cognitivas, de la Universidad de Trento, Italia, y colaborador honorífico del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Universidad Miguel Hernández de Elche, codirector de la tesis doctoral

INFORMA:

Que Dña Ana María Segura Paños, ha realizado bajo mi supervisión el trabajo titulado “**Relevancia funcional de los polimorfismos del gen de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y microRNA circulantes, en pacientes con cardiopatía isquémica y disfunción eréctil**”, conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Alicante a 6 de abril de 2024.

Dr Thomas Zandonai

Codirector de la tesis





La Dra. Dña. Piedad N. De Aza Moya, Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 3120/19, de 09 de diciembre de 2019

**INFORMA:**

Que Dña. Ana María Segura Paños, ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “**Relevancia funcional de los polimorfismos del gen de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y microRNA circulantes en pacientes con cardiopatía isquémica y disfunción eréctil**”, conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como Tesis Doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Elche a 6 de abril de 2024.

Dra. Dña. Piedad N. De Aza Moya

Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería







La presente tesis doctoral titulada “**Relevancia funcional de los polimorfismos del gen de la enzima óxido nítrico endotelial (eNOS) y microRNA circulantes, en pacientes con cardiopatía isquémica y disfunción eréctil**”, se presenta como TESIS DOCTORAL CONVENCIONAL mostrándose en el Anexo I, los artículos publicados o en revisión, vinculados con la misma.

### **PUBLICACIONES EN REVISTAS DE IMPACTO**

- 1. Segura A**, Ballester P, Ajo R, Inda MD, Urbano A, Muriel J, Ochando I, Margarit C, Martínez E, Peiró AM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and erectile dysfunction in chronic pain. *Gene*. 2019;721S:100005.  
Scimago (Scopus- Scimago Journal & Country Rank): **Q1**  
Factor de Impacto (2020): 3.688 (Medicine Miscellaneous)
- 2.** Ors D, **Segura A**, Arrarte V, Ballester P, Muriel J, Fernández G, Soriano J, Peiró AM. Erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease and the potential influence of genetic markers. *Rev Int Androl*. 2021 Oct-Dec;19(4):217-223.  
Scimago (Scopus- Scimago Journal & Country Rank): **Q3**  
Factor de Impacto (2021): 0.660 (Medicine Miscellaneous)
- 3.** Agulló L\*, **Segura A\***, Ortuño-Miquel S, Brinca AT, Micol-Ponce R, Arrarte V, Ponce MR, Miró P, Zandonai T, Peiró AM. Circulating miRNA-21 is a promising biomarker for cardiovascular events in erectile dysfunction patients. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2024. 11.  
Scimago (Scopus- Scimago Journal & Country Rank): **Q1**  
Factor de Impacto (2023): 3.6 (Cardiology and Cardiovascular Medicine)  
*\* Ambas autoras han contribuido a partes iguales a este trabajo y comparten la primera autoría.*



## PUBLICACIONES EN REVISIÓN

**1. Segura A,** Muriel J, Miró P, Agulló L, Arrarte V, Zandonai T, Peiró AM  
Erectile dysfunction in high risk cardiovascular patients: a prospective study of eNOS  
gene polymorphisms *T-786C*, *G894T* and *INTRON VNTR* functional interaction. 2023.  
Andrology [en revisión]

Scimago (Scopus- Scimago Journal & Country Rank): **Q1**

Factor de Impacto (2023): 4.5 (Andrology (Science))





## FINANCIACION

La presente Tesis Doctoral ha recibido las siguientes ayudas:

- **Proyecto OPIPAIN-Gene:** Convenio de colaboración entre el Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL) y la compañía farmacéutica Menarini. IP Ana M<sup>a</sup> Segura Paños. 12.500 euros.

Código: AE11-038

- **Proyecto OPICARDIO** se llevó a cabo con fondos propios del grupo de Investigación número 10 perteneciente al Grupo de Investigación de Neurofarmacología aplicada al dolor (NED) y fondos de la Plataforma Farmacogenética, todos enmarcados en ISABIAL.





## AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis, Ana Peiró y a Thomas Zandonai, mi codirector y a todos los que me habéis ayudado con vuestra colaboración y paciencia. De ellos he aprendido la persistencia heroica que supone liderar y pertenecer a un grupo de investigación independiente.

El período del doctorado es un camino largo de maduración cerebral hacia una mentalidad científica. Son muchas las personas desde la clínica como del laboratorio que han apoyado con su tiempo, esfuerzo y paciencia. A los Drs. Margarit y Arrarte, por dejarse permear hacia la Andrología.

A los investigadores predoctorales y postdoctorales, por el apoyo estadístico y biomolecular: Drs Ballester, Muriel, Inda y Barrachina. Las que se sumaron posteriormente como las Dras Escorial y Agulló.

A todos los estudiantes del grupo de investigación que han pasado veranos e inviernos apoyando con el manejo de las muestras.

A mi familia, porque una forma de querer es haber tenido paciencia.

A mi madre, por haberme contado cuentos porque era pequeña.

GRACIAS A TODOS





## INDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS .....	19
LISTADO TABLAS .....	21
LISTADO DE FIGURAS .....	21
RESUMEN .....	23
ABSTRACT.....	25
1.INTRODUCCIÓN.....	27
1.1. Disfunción eréctil.....	28
1.1.1. Prevalencia de la disfunción eréctil.....	28
1.1.2. Fisiología de la erección.....	31
1.1.3. Inhibidores de la fosfodiesterasa 5: mecanismo de acción.....	33
1.1.4. Etiología de la disfunción eréctil.....	33
1.1.5. Disfunción eréctil y dolor crónico no oncológico.....	34
1.1.6. Disfunción eréctil y enfermedad cardiovascular.....	35
1.1.7. Abordaje diagnóstico- terapéutico en pacientes con disfunción eréctil y enfermedad cardiovascular.....	36
1.1.8. Programas de rehabilitación cardiaca.....	38
1.2. Marcadores farmacogenéticos.....	39
1.2.1. Fisiopatología de la erección e implicación del gen eNOS.....	40
1.3. microRNA como nuevos biomarcadores.....	43
1.3.1. Variabilidad individual en la respuesta farmacológica.....	44
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	45
2.1. Hipótesis.....	45
2.2. Objetivos.....	46
2.2.1 Objetivo principal.....	46
2.2.2. Objetivos secundarios.....	46
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1. Desarrollo de los Proyectos de Investigación.....	48
3.2. Variables Recogidas.....	50
3.3. Aspectos Éticos.....	52
3.3.1. Consideraciones generales.....	52
3.3.2. Beneficios y riesgos potenciales para los pacientes.....	53

4. RESULTADOS.....	54
4.1. Proyecto 1: OPIPAIN-Gene.....	54
4.2. Proyecto 2: OPICARDIO.....	55
4.3. Proyecto 3: OPICARDIO-microRNA.....	57
5. DISCUSIÓN .....	58
5.1. Disfunción eréctil como síntoma centinela en la enfermedad cardiovascular.....	58
5.2. Ciencias ómicas aplicadas a la disfunción eréctil.....	59
5.2.1. Farmacogenética aplicada al tratamiento andrológico.....	60
5.2.2. MicroRNA en el paciente con disfunción eréctil y/o enfermedad cardiovascular .....	62
6. LIMITACIONES Y ANÁLISIS DAFO.....	64
7. LÍNEAS FUTURAS.....	67
8. CONCLUSIONES.....	69
9. BIBLIOGRAFÍA.....	71
10. ANEXOS.....	79
ANEXO I - Artículos Tesis Doctoral publicados.....	79
ANEXO II - Artículos Tesis Doctoral en revisión.....	105
ANEXO III – Aprobación Comités Ética.....	137
ANEXO IV – Cuestionarios utilizados.....	145

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
CC	Cuerpos Cavernosos
Ca <sup>+2</sup>	Calcio
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CGI-GI	Escala de impresión Global Clínica-Mejoría Global
CV	Cardiovascular
DCNO	Dolor crónico no oncológico
DE	Disfunción Eréctil
DM	Diabetes Mellitus
FRCV	Factores de Riesgo Cardiovascular
eNOS	ON sintetasa endotelial
ECV	Enfermedad Cardiovascular
EVA	Escala Visual Analógica
GPT	Glutámico Pirúvica Transaminasa
GMP <sub>c</sub>	Monofosfato de Guanosina Cíclico
HAD	Cuestionario Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión
HGUDrB	Hospital General Universitario de Alicante Dr Balmis
HTA	Hipertensión arterial
IC	Intervalo de Confianza
IIEF	Índice Internacional de Función Eréctil
IIFE-FE	Índice Internacional de Función Eréctil- Dominio Función Eréctil
iPDE5	Inhibidores de la fosfodiesterasa 5
ISABIAL	Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
miRNA	microRNA
mSLQQ	Cuestionario de Calidad de vida Sexual modificado
ON	Óxido Nítrico
NOS	NO-sintetasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de Naciones Unidas
OR	Odds Ratio
PDE	Fosfodiesterasa
p.ej.	Por ejemplo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RR	Riesgo Relativo
RHC	Rehabilitación Cardíaca
RCV	Riesgo Cardiovascular
UDO	Unidad del Dolor



## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Principales causas de disfunción eréctil de etiología orgánica.

Tabla 2. Estratificación del riesgo cardiovascular.

Tabla 3. Variantes genéticas del gen eNOS.

Tabla 4. Información y actividades resumidas de cada uno de los tres proyectos que conforman la presente Tesis Doctoral.

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de la disfunción eréctil (DE) según la edad. Figura modificada del estudio Envejecimiento de Varones de Massachusetts (MMAS) de Feldman y cols., 1994.

Figura 2. Prevalencia y severidad por grupos de edad del estudio Epidemiología de La Disfunción Eréctil Masculina (EDEM). Figura modificada de Martin-Morales y cols., 2001.

Figura 3. Mecanismo de la erección peneana de-óxido nítrico (ON)/monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Figura modificada de Lue y cols., 2000.

Figura 4. Algoritmo diagnóstico en pacientes con riesgo cardiovascular. Figura modificada de Jackson y cols., 2006.

Figura 5. Cronograma Tesis Doctoral.



## RESUMEN

**Introducción.** La disfunción eréctil (DE) es considerada una señal de alarma que puede predecir enfermedades cardiovasculares (ECV). Ésta se relaciona con la disfunción endotelial y con la reducción del óxido nítrico (ON). Además, un creciente número de estudios han explorado los microRNA (miRNA) como nuevos biomarcadores, al estar involucrados en la patogenia de la DE.

**Objetivo.** Nuestro objetivo fue analizar el impacto funcional de las variantes genéticas del gen que codifican la enzima ON sintetasa endotelial (eNOS), y de los miRNA en los pacientes con DE y ECV, tanto en los que presentan la DE como síntoma centinela como en los que presentan ECV conocida y refieren DE.

**Material y métodos.** Estudio observacional, prospectivo, en dos grupos de pacientes: a) dolor crónico no oncológico (DCNO) (n=125) y b) ECV con DE del Programa de Rehabilitación Cardíaca (n=112). Se recogieron variables demográficas, clínicas (cuestionario Índice Internacional de Función Eréctil [IIEF], calidad de vida sexual [cuestionario mSLQQ], ansiedad y depresión) junto con los factores de riesgo cardiovascular (FRCV). El análisis de los polimorfismos T-786C, G894T del gen eNOS se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), analizándose la expresión del miRNA21.

**Resultados.** En el grupo de DCNO (n=84 con DE; 57,9 ± 11 años; 73% grave y baja percepción de su calidad de vida sexual) se observó mejoría clínica en el 76% de los casos, siendo significativamente mejor en pacientes 786CC. El análisis de regresión multivariante indicó que la edad y el alelo786C impactaban en el riesgo y la gravedad de la DE. En el grupo de ECV (n=112 con DE; 60 ± 9 años, 66% DE grave, 56% fracción de eyección), la DE fue la primera manifestación clínica o concomitante a la ECV en el 62% de los casos. En este grupo, se observó una mayor susceptibilidad a la DE entre los genotipos 786-TT y aa/ac del intrón 4 VNTR. Después de 3 meses de tratamiento con iPDE5, se observó una mejora significativa de la DE (IIEF, 50 ± 16 puntos y IIEF-FE 21 ± 10 puntos, p<0,001) y de la calidad de vida sexual (mSLQQ-QOL 55 ± 23 puntos, p<0,001). La fracción de eyección cardíaca estuvo influenciada positivamente al mejorar la calidad de vida sexual (p=0,1941) y ligeramente por eNOS G894T (p=0,076). En un subgrupo la expresión de miRNA21 fue mayor en pacientes con DE frente a los controles ECV con/sin DE.

**Conclusión.** El manejo de la DE ha mejorado su calidad de vida sexual donde, las variantes del gen eNOS podrían influir tanto en la vulnerabilidad como en la respuesta al tratamiento andrológico, sobre todo, en pacientes con DCNO 786-CC. En los pacientes con ECV se observó una relación inversa entre la DE y la expresión de miRNA21. Su relevancia radica en el potencial del miARN como biomarcador pronóstico a implementar en la medicina cardiovascular.

**Palabras clave:** disfunción eréctil; enfermedad cardiovascular; gen eNOS; microRNA21; biomarcadores; dolor crónico





## ABSTRACT

**Introduction.** Erectile dysfunction (ED) is considered a warning sign that may predict cardiovascular disease (CVD). It is related to endothelial dysfunction and nitric oxide (NO) depletion. In addition, a growing number of studies have explored microRNAs (miRNAs) as new biomarkers, as they are involved in the pathogenesis of ED.

**Objective.** Our aim was to analyse the functional impact of genetic variants of the gene encoding the enzyme endothelial NO synthetase (eNOS), and of miRNAs in patients with ED and CVD, both in those with ED as a sentinel symptom and in those with known CVD and referred ED.

**Material and methods.** Prospective, observational study in two groups of patients: a) chronic non-oncological pain (CNOP) (n=125) and b) CVD with ED in the Cardiac Rehabilitation Program (n=112). Demographic, clinical variables (International Index of Erectile Function [IIEF] questionnaire, sexual quality of life [mSLQQ questionnaire], anxiety and depression) along with cardiovascular risk factors (CVRFs) were collected. Analysis of the T-786C, G894T polymorphisms of the eNOS gene was performed by polymerase chain reaction (RT-PCR), analysing the expression of miRNA21.

**Results.** In the CNOP group (n=84 with ED;  $57.9 \pm 11$  years; 73% severe and low perception of their sexual quality of life) clinical improvement was observed in 76% of cases, being significantly better in 786CC patients. Multivariate regression analysis indicated that age and 786C allele impacted ED risk and severity. In the CVD group (n=112 with ED;  $60 \pm 9$  years, 66% severe ED, 56% ejection fraction), ED was the first clinical or concomitant manifestation of CVD in 62% of cases. In this group, increased susceptibility to ED was observed among 786-TT and aa/ac VNTR intron 4 genotypes. After 3 months of iPDE5 treatment, a significant improvement in ED (IIEF,  $50 \pm 16$  points and IIEF-FE  $21 \pm 10$  points,  $p < 0.001$ ) and sexual quality of life (mSLQQ-QOL  $55 \pm 23$  points,  $p < 0.001$ ) was observed. Cardiac ejection fraction was positively influenced by improved sexual quality of life ( $p = 0.1941$ ) and slightly by eNOS G894T ( $p = 0.076$ ). In a subgroup miRNA21 expression was higher in patients with ED versus CVD controls with/without ED.

**Conclusion.** The management of ED has improved their sexual quality of life where, eNOS gene variants could influence both vulnerability and response to andrological treatment, especially in patients with DCNO 786-CC. An inverse relationship between ED and miRNA expression was observed in patients with CVD21. Its relevance lies in the potential of miRNA as a prognostic biomarker to be implemented in cardiovascular medicine.

**Keywords:** erectile dysfunction; cardiovascular disease; eNOS gene; microRNA21; biomarkers; chronic pain.



## 1. INTRODUCCIÓN

La salud sexual es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como "un estado de bienestar físico, emocional, mental y social relacionado con la sexualidad" [1], constituyendo un componente más de la salud integral de la persona. Está influenciada por factores biológicos, culturales, éticos, históricos, económicos, políticos, legales, religiosos y espirituales.

Las disfunciones sexuales, aun no siendo enfermedades en sentido estricto, son problemas de salud que impactan de forma importante en la vida de quien las padece, pudiendo afectar la calidad de vida del individuo y su pareja. Hablamos de disfunción sexual cuando se altera alguna de las etapas de la respuesta sexual humana.

Las alteraciones de la salud sexual masculina se pueden clasificar como: alteraciones de la libido, de la erección, de la eyaculación, del orgasmo y de la satisfacción. A pesar de no ser la más prevalente, la alteración de la erección o disfunción eréctil (DE) supone uno de los principales motivos de consulta, siendo en ocasiones la punta del iceberg de patologías de base subyacentes no diagnosticadas, lo que le ha concedido el término de "**síntoma centinela**" [2].

Por otro lado, la aparición en el mercado del primer inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 (iPDE5) en 1998 (Sildenafil - Viagra®), nos brindó una herramienta farmacológica eficaz, segura y cómoda para el tratamiento de la DE. No sólo supuso una mejora en el manejo terapéutico, sino que abrió nuevas vías de investigación básica y clínica de la DE.

Además, la gran repercusión social que tuvo influyó en la creciente sensibilización y demanda de información por parte de la población.

En los últimos años, la "medicina personalizada de precisión" ha irrumpido en nuestra práctica clínica. La posibilidad de tratar a los pacientes en función de sus circunstancias individuales supone una nueva realidad asistencial. Abordar la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades teniendo en cuenta el material genético y los factores ambientales, supone un importante reto para los profesionales de la salud.

El presente proyecto surgió de la colaboración entre la **Unidad de Dolor** (UDO) del Servicio de Anestesia y Reanimación del Hospital General Universitario de Alicante Dr Balmis (HGUDrB) y la **Unidad de Andrología** del Servicio de Urología del mismo hospital, con un primer estudio observacional sobre hipogonadismo y disfunción sexual masculina asociada al tratamiento del dolor crónico con fármacos opioides, efecto adverso frecuentemente infradiagnosticado en este ámbito [3,4]. De aquí surgieron otras líneas de investigación, entre las que se encuentran la que se expone en la presente tesis doctoral, que abrió una vía de colaboración y de investigación clínica con el Servicio de Cardiología del HGUDrB.

## 1.1 DISFUNCIÓN ERÉCTIL

La DE se define como la incapacidad persistente o recurrente para conseguir y/o mantener una erección suficiente como para conseguir una relación sexual satisfactoria [5]. Es un proceso multifactorial en el que intervienen factores vasculares, neurológicos, hormonales y psicógenos.

### 1.1.1. Prevalencia de la disfunción eréctil

La DE es una patología edad-dependiente. Los primeros estudios poblacionales publicados datan de principios de los años 90 y aún conservan su vigencia. El Estudio de Envejecimiento de Varones de Massachusetts (*Massachusetts Male Aging Study, MMAS*) [6] fue el primer estudio que demostró la asociación existente entre la función sexual, el envejecimiento y la salud masculina (Figura 1). Esta encuesta, ampliamente citada, se realizó en Estados Unidos entre 1987 y 1989 en 1.290 varones de entre 40 y 70 años. Describe una prevalencia global del 52% (17% DE leve, 25% moderada y 10% severa) y objetivó que la prevalencia de la DE aumenta con la edad; la probabilidad de DE severa aumenta del 5,1 al 17 % y la DE moderada del 15 al 34 % entre los 40 y 70 años de edad. Sin embargo, la DE leve permanece constante entre los 40 y los 70 años.

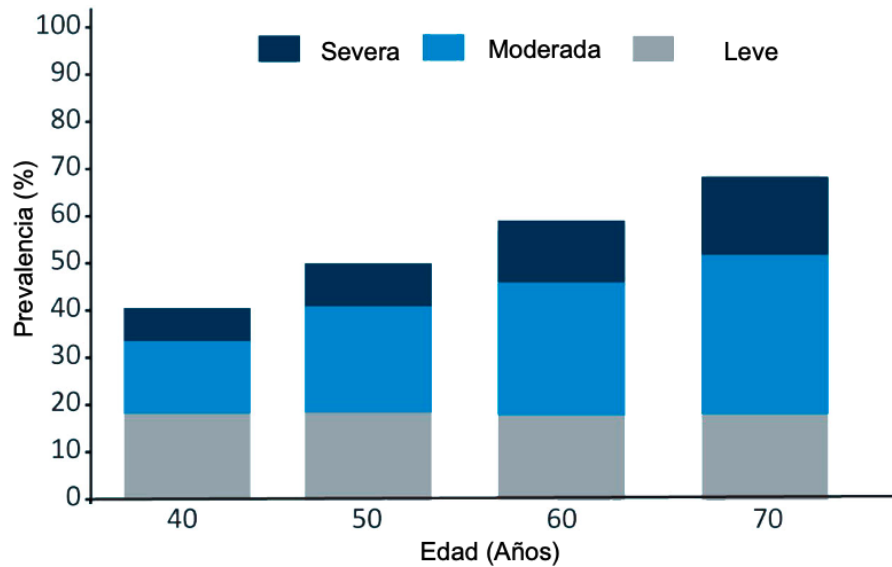


Figura 1. Prevalencia de la disfunción eréctil (DE) según la edad. Figura modificada del estudio Envejecimiento de Varones de Massachusetts (MMAS) de Feldman y cols., 1994 [6].

En España, el estudio **Epidemiología de La Disfunción Eréctil Masculina** (EDEM), publicado por Martín-Morales y cols., (2001) evaluó a 2.476 varones de entre 25 y 70 años, seleccionados aleatoriamente (Figura 2). La prevalencia fluctuó entre el 12,1%-19% según el criterio empleado. Al utilizar el dominio función eréctil (FE) del cuestionario Índice Internacional de Función Eréctil (IIEF), la prevalencia global estimada de DE fue del 18,9% (leve 1,6%, moderada 2,1% y severa 0,6%), encontrándose algún grado de DE en el 12,1% (leve 5,2%, moderada 5% y severa 1,9%), al utilizar una pregunta de autoevaluación. Dicha prevalencia aumentaba con la edad (según IIEF-FE: 8,5% en varones de 25-39 años, 13,7% de 40-49 años, 25,5% entre 50-59 años, 48,25% en sujetos de 60-70 años y 18,9% en mayores de 70 años) [7].

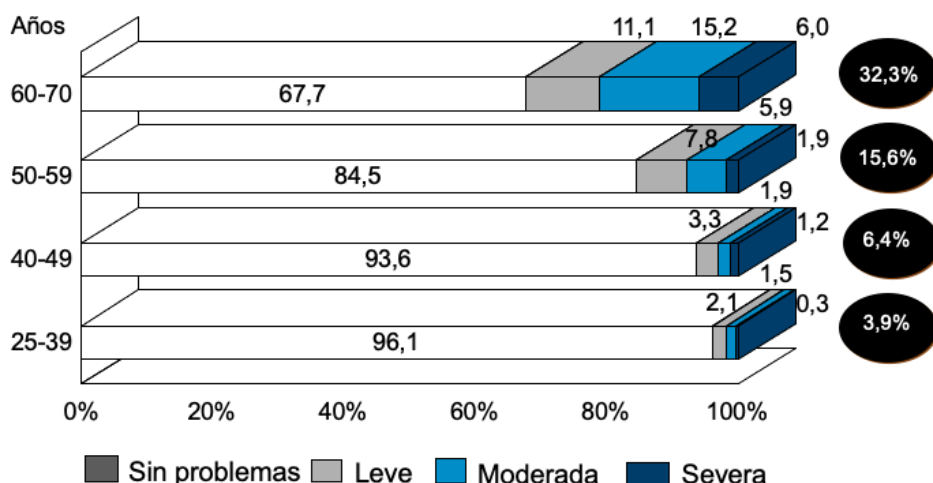


Figura 2. Prevalencia y severidad por grupos de edad del estudio Epidemiología de La Disfunción Eréctil Masculina (EDEM). Figura modificada de Martin-Morales y cols., 2001 [7].

Actualmente existen muchos estudios epidemiológicos bien controlados que confirman la alta prevalencia de DE en la población general [8]. Usando los datos del MMAS y las proyecciones de población según la Organización de las Naciones Unidas (ONU), Ayta y cols., (1999) calcularon que la incidencia mundial de DE será de hasta 322 millones en el año 2025, produciéndose este incremento sobre todo en países en vías de desarrollo (Asia, África y América del Sur) y asociado a una población mundial de edad avanzada [9]. Existen otras situaciones relacionadas que pueden estar contribuyendo a este aumento de la DE ya que el envejecimiento se asocia con la aparición de otras comorbilidades que pueden desencadenar o agravar esta disfunción.

Ante estos datos podemos contemplar la DE como un auténtico problema de salud en el hombre y debería ser, por tanto, una causa frecuente de consulta para los especialistas en Atención Primaria, pero a día de hoy, sigue siendo una enfermedad infradiagnosticada e infratratada en nuestro medio [10]. A esto sin duda contribuye la falta de formación sobre salud sexual de los profesionales sanitarios y la dificultad que puede suponer tanto a los profesionales como a los pacientes abordar los problemas relacionados con la esfera sexual por factores culturales y morales, entre otros.

El incremento de la prevalencia de DE, combinado con las nuevas tendencias diagnósticas y los tratamientos farmacológicos disponibles, obliga a un abordaje integral y actualizado de estos pacientes, considerando tanto factores genéticos como los de riesgo específico de cada individuo. Para conseguirlo, se requiere una perspectiva multidisciplinar que nos permita evaluar y diseñar un plan de tratamiento que aborde todas las dimensiones de la enfermedad.

### **1.1.2. Fisiología de la erección**

La erección es un evento neurovascular complejo modulado por factores psicológicos y hormonales. El tejido eréctil está compuesto por músculo liso que rodea los sinusoides vasculares, recubiertos por endotelio. Los cambios hemodinámicos ocurren en el cuerpo cavernoso (CC). Los estados de erección y flaccidez dependen del flujo de entrada y salida de sangre del CC. En el estado de flaccidez estos flujos están equilibrados, mientras que en estado de erección el flujo de entrada excede al de salida.

Durante la excitación sexual, la descarga de neurotransmisores como el óxido nítrico (ON) y de otros factores por parte de los nervios erectores y de las células endoteliales, conduce a la relajación del músculo liso en las arterias, arteriolas y trabéculas que abastecen al tejido eréctil, con la consecuente dilatación de las mismas, mayor aporte de flujo sanguíneo y aumento de volumen (tumescencia) y rigidez. La expansión vascular provoca la compresión del plexo venoso entre las trabéculas y la túnica albugínea (capa fibrosa que envuelve al CC), lo que conlleva la oclusión del flujo de salida venoso (mecanismo córporeno-oclusivo) [11,12]. La contracción del músculo liso trabecular vuelve a abrir los vasos venosos, la sangre atrapada es expulsada, y vuelve la flaccidez (detumescencia) [12].

Hay consenso en que la vía de señalización de mayor relevancia fisiológica para iniciar y mantener el mecanismo de erección es el sistema ON/GMPc. Por otro lado, la contracción y relajación del músculo liso están reguladas por calcio intracelular ( $Ca^{+2}$ ) [12].

El ON es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) usando la arginina como sustrato. El ON no tiene un receptor específico en la membrana celular, sino que su diana es la enzima guanilatociclasa. Una vez activada, esta enzima cataliza la conversión de trifosfato de guanosina (GTP) en monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), principal mediador intracelular de las acciones fisiológicas del ON. La acumulación de GMPc desencadena una serie de reacciones que finalizan en una reducción en el  $\text{Ca}^{2+}$  y la relajación del músculo liso cavernoso

Existe a su vez, un mecanismo que regula la concentración intracelular de GMPc por medio de una enzima denominada Fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5). Esta PDE5 hidroliza al GMPc y por tanto, pueden reducir la concentración de estas moléculas, conduciendo en última instancia a la contracción del músculo liso (detumescencia) [12,13] (Figura 3).

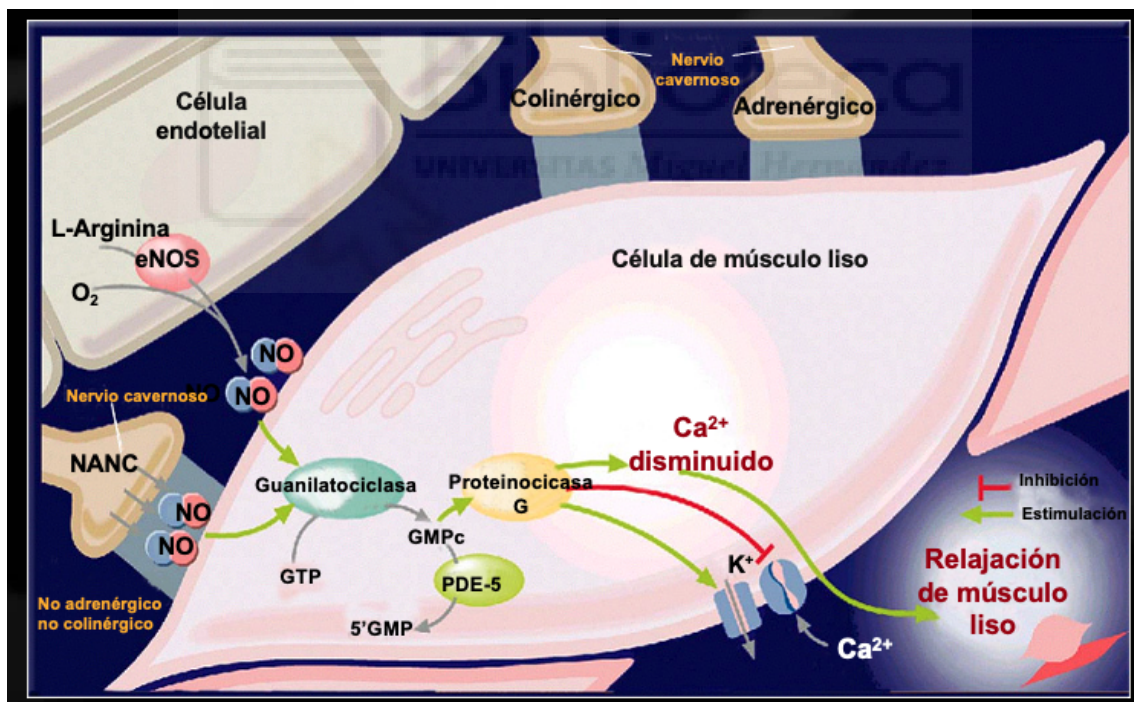


Figura 3. Mecanismo de la erección penénea de-óxido nítrico (ON)/monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Figura modificada de Lue y cols., 2000 [13].



### 1.1.3. iPDE5: mecanismo de acción

Las fosfodiesterasas (PDE) son enzimas que regulan la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos, encontrándose en distintos órganos. La PDE5 es la predominante en el cuerpo cavernoso, pero también podemos encontrarla en otros tejidos, lo que explica la aparición de efectos adversos tras su inhibición.

La relajación del músculo liso del pene está mediada por el GMPc. La PDE-5 es específica para la vía de ON/GMPc en el tejido cavernoso humano; su inhibición provoca un aumento de GMPc, facilitando la erección. Actualmente disponemos de cuatro moléculas: sildenafil, tadalafil, vardenafil y avanafil. Todos ellos con resultados similares en términos de eficacia y seguridad. Se han realizado múltiples estudios con los cuatro iPDE5, encontrándose eficacia similar para todos ellos, cercana al 80%, en todos los grados de severidad de la DE e independientemente de comorbilidades [14]. Aun así, hay pacientes que no responden a estos fármacos.

### 1.1.4. Etiología de la DE. Factores de riesgo

La DE implica habitualmente una combinación de factores psicógenos y orgánicos. Existen varios factores de riesgo y/o predictores de DE, que se detallan en la Tabla 1.

Causas vasculares (60-80%)	Causas neurológicas (10-20%)	Causas hormonales (5-10%)
Arterioesclerosis Tabaco Hiperlipemia Hipertensión Arterial Diabetes  Enfermedad de Peyronie Fracturas pélvicas Traumatismos perineales Fractura de cuerpo cavernosos Trasplante renal heterotópico Síndrome de Leriche  Bypass aortoiliaco o aortofemoral Secuelas de radioterapia Secuelas de priapismo	Sistema Nervioso Central AVC Síndrome de Apnea del sueño Enfermedad de Alzheimer Enfermedad de Parkinson Tumor cerebral Médula espinal Traumatismos Hernia discal Esclerosis múltiple Tumor medular Infarto medular Mielomeningocele Tabes dorsal Nervios periféricos  Neuropatía diabética Neuropatía alcohólica Secuelas posquirúrgicas Prostatectomía Cistoprostatectomía RTU Cirugía de médula espinal Amputación rectal	Exceso de estrógenos Iatrogénico exógeno Hepatopatías Tumores productores de estradiol o HCG  Hiperprolactinemias Iatrogénicas por fármacos Tumor hipofisario  Hipogonadismo Hipogonadotrópicos Hipergonadotrópicos  Disfunciones tiroideas  Hipertiroidismo Hipotiroidismo  Disfunciones suprarrenales Síndrome y enfermedad de Cushing Insuficiencia suprarrenal Hiponutriciones graves

Tabla 1. Principales causas de disfunción eréctil de etiología orgánica [15].

### 1.1.5. DE y dolor crónico no oncológico

La conciencia de tratar adecuadamente el dolor, en especial el dolor crónico no oncológico (DCNO), es cada vez mayor siendo los opioides los fármacos analgésicos más prescritos en las unidades especializadas.

Dentro de sus efectos secundarios están los relacionados con la esfera sexual debido al hipogonadismo producido por la influencia de los opioides sobre el eje gonadal pituitario hipotalámico [16,17]. Los opioides inhiben la producción de la hormona liberadora de gonadotropinas, reduciendo después la liberación de la hormona luteinizante (LH) y acompañándose de disfunción sexual que en el hombre se puede manifestar como disminución de la libido y/o DE.

Desafortunadamente, estos síntomas de alto impacto en la calidad de vida del paciente no suelen registrarse, lo cual justifica aún más su correcto diagnóstico y tratamiento. Nuestro grupo encontró una prevalencia de DE en el 27,6% de los hombres en seguimiento en la UDO del HGUDrB por tratamiento crónico con opioides y una tasa de respuesta al tratamiento andrológico (iPDE5 y/o tratamiento hormonal sustitutivo con testosterona) del 42% [18].

La variabilidad en la respuesta analgésica a los opioides es un fenómeno común que se observa en la práctica clínica, lo que podría influir en la respuesta al tratamiento de la DE. La respuesta a los iPDE5 en estos pacientes puede variar significativamente y todavía no se comprenden completamente sus causas, aunque sabemos que está condicionada por factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los factores intrínsecos cabe destacar la genética del individuo (farmacogenética). Los factores predictivos genéticos de respuesta al tratamiento de la DE, específicamente con iPDE5, pueden ayudar a obtener más información sobre los pacientes no respondedores y a solventar alguna de las lagunas de conocimiento sobre la prevalencia de la DE y la influencia de la farmacogenética en pacientes con DCNO.

### 1.1.6. DE y enfermedad cardiovascular

La ECV es la primera causa de morbimortalidad en nuestro medio. Según la *World Heart Federation* causa 17,9 millones de muertes anuales en todo el mundo. La cardiopatía isquémica es la principal expresión de ECV.

La asociación entre los factores de riesgo vascular (FRCV) y la DE es clara y está bien documentada en la literatura. DE y ECV frecuentemente coexisten. Estas entidades comparten los mismos factores de riesgo (edad, hipertensión [HTA], diabetes mellitus [DM], dislipemia, tabaquismo, obesidad, arteriosclerosis, sedentarismo), lo que explica la alta incidencia de esta disfunción sexual en el paciente coronario [19].

Ya los estudios epidemiológicos MMAS y EDEM apuntaban la existencia de la asociación entre ambas entidades. Mas recientemente, en una revisión de cinco meta-análisis y dos revisiones sistemáticas que investigaron la asociación DE-ECV, se evidenció mayor riesgo de ECV (riesgo relativo [RR] 1,45, IC del 95%: 1,36- 1,54), de enfermedad coronaria (RR 1,50, IC 95% 1,37-1,64), de infarto de miocardio (RR 1,55, IC 95% IC 1,33-1,80) y de accidente cerebrovascular (RR 1,36, IC 95% 1,26-1,46) en los pacientes con DE que en otros pacientes [20].

Además, la literatura también ha demostrado la correlación entre el grado de la DE y el riesgo de ECV. En hombres sin ECV previa, los que presentaban DE severa tenían mayor riesgo de cardiopatía isquémica (RR 1,60; IC 95 %, 1,31–1,95) que los grados más leves [21].

Existen dos hipótesis que relacionan DE y ECV:

1. Disfunción endotelial: primera manifestación de arteriosclerosis. A nivel celular, supone una alteración en el equilibrio entre la síntesis y degradación del ON. El estrés oxidativo resultante y el desequilibrio del ON lleva al aumento de la adhesión y agregación plaquetaria, a la liberación de sustancias vasoconstrictoras y a la posible obstrucción vascular posterior [22].

2. Tamaño arterial: el diámetro de las arterias cavernosas es menor que el de las arterias coronarias o las periféricas (carótida, femoral). Las arterias pequeñas son más susceptibles a la oclusión por arteriosclerosis, por lo que la DE sería la primera manifestación, precediendo a la clínica sistémica [23].

En los últimos años se ha hecho hincapié en el papel de la DE como posible marcador de distintas patologías. Actualmente no entendemos la DE como una complicación secundaria, sino **como una manifestación temprana de arteriosclerosis y como posible precursora de ECV sistémica**. Considerar la **DE como marcador de una patología subyacente no diagnosticada (“síntoma centinela”)** es algo de importante relevancia clínica, ya que nos permite actuar de forma preventiva sobre la salud del paciente [24].

Vlachopoulos y cols., publicaron en 2005 que la DE podía llegar a preceder a la ECV hasta en unos cinco años [25]. Un año más tarde, Montorsi y cols., (2006) publican un estudio de casos (síndrome coronario agudo y crónico) y controles con 285 pacientes y concluyen que, en el grupo de pacientes de síndrome coronario crónico, hasta en el 93% de los casos la DE aparecía en promedio 2-3 años antes de la aparición de enfermedad coronaria [26].

Así pues, podemos afirmar que actualmente existe evidencia científica de calidad que demuestra que la DE es una manifestación precoz de ECV coronaria y por tanto no debe tratarse como una entidad aislada. Es importante una detección temprana junto a un adecuado tratamiento para mejorar tanto la calidad de vida sexual, como la prevención de ECV [27,28].

### **1.1.7. Abordaje diagnóstico- terapéutico en pacientes con DE y ECV**

Para muchos pacientes, la consulta por DE puede suponer su primera oportunidad para someterse a una evaluación sistémica y somos conocedores del riesgo oculto que conlleva en ocasiones la aparición de DE. Podemos decir que un hombre con DE sin síntomas cardíacos es un paciente vascular o cardíaco hasta que no se demuestre lo contrario [27], por lo que podemos plantearnos la DE como una oportunidad de reducir este riesgo

En el diagnóstico de la DE podemos encontrarnos ante estas dos posibilidades:

- Paciente en el que la DE puede ser síntoma centinela
- Paciente con ECV que además refieren DE.

Dependiendo del perfil de paciente estableceremos nuestra línea a seguir:

- Evaluación de los FRCV en pacientes con DE
- Reestratificación del riesgo cardiovascular (RCV) en pacientes cardiopatas con DE.

La estratificación del RCV y la actividad sexual se recoge en la guía publicada tras la II Conferencia del Consenso de Princeton [27]. En este documento se presentan las recomendaciones para la práctica clínica, clasificando a los pacientes en tres grupos según su riesgo cardíaco ante la actividad sexual: bajo, moderado y alto (Tabla 2).

Categoría de riesgo bajo	Categoría de riesgo intermedio	Categoría de riesgo alto
Asintomático, < 3 factores de riesgo de EC (salvo sexo)	≥ 3 factores de riesgo de EC (salvo sexo)	Arritmias de alto riesgo
Angina de pecho leve y estable (evaluada o en tratamiento)	Angina de pecho moderada y estable	Angina de pecho inestable o rebelde al tratamiento
IM previo no complicado	IM reciente (> 2 y < 6 semanas)	IM reciente (< 2 semanas)
DVI/ICC (clase I de la NYHA)	DVI/ICC (clase II de la NYHA)	DVI/ICC (clase III/IV de la NYHA)
Revascularización coronaria satisfactoria	Secuelas extracardiacas de enfermedad aterosclerótica (por ejemplo, ictus o vasculopatía periférica)	Miocardiopatía hipertrófica obstructiva y otras miocardiopatías
Hipertensión arterial controlada		Hipertensión arterial no controlada
Valvulopatía leve		Valvulopatía moderada o grave

*EC = enfermedad coronaria; ICC = insuficiencia cardíaca congestiva; DVI = disfunción ventricular izquierda; IM = infarto de miocardio; NYHA = New York Heart Association.*

**Tabla 2. Estratificación del riesgo cardiovascular. Modificada de DeBusk y cols., 2000 [29].**

El riesgo de presentar un evento CV depende de la existencia previa de tres factores mayores y/o ECV previa. Por factores mayores se entiende: edad, DM, HTA, hiperlipemia, tabaquismo, obesidad y sedentarismo.

La actividad sexual no es un desencadenante importante de cardiopatía isquémica. Muller y cols., (1996) estudiaron el riesgo de infarto de miocardio (IAM) no fatal desencadenado por la actividad sexual. El riesgo de IAM en un hombre de 50 años sin FRCV durante la actividad normal diaria es muy bajo (un

caso entre un millón). El RR de IAM en las 2 horas posteriores a la actividad sexual es de 2,5 (IC 95 %, 1,7-3,7). El RR de desencadenar la aparición de un IAM entre pacientes con antecedentes de cardiopatía isquémica (angor/IAM) no fue mayor que el observado en aquellos sin ECV previa. La actividad sexual fue un factor probable que contribuyó a la aparición de IAM en sólo el 0,9% de los casos [30].

En términos generales podemos decir que aquellos pacientes incluidos en la categoría de bajo o riesgo intermedio pueden ser tratados de su DE sin la necesidad de estudios adicionales. En los pacientes incluidos en el grupo de alto riesgo, el abordaje de la DE debe ser secundario a la estabilización de la ECV.

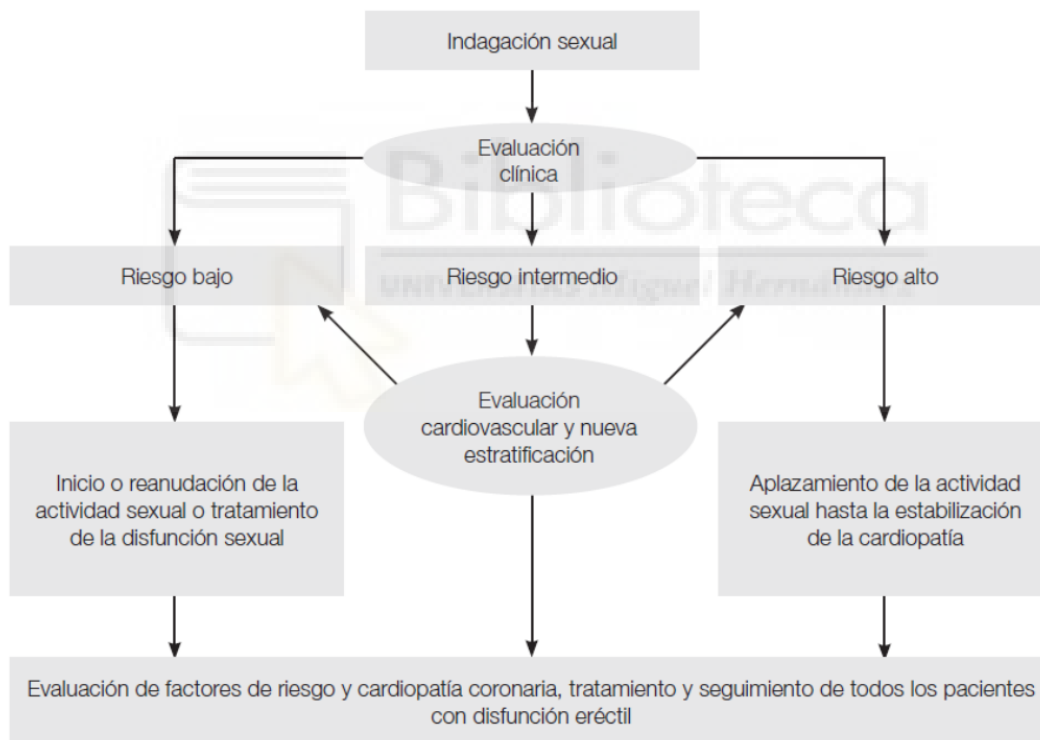


Figura 4. Algoritmo diagnóstico en pacientes con riesgo cardiovascular. Figura modificada de Jackson y cols., 2006 [27].

### 1.1.8. Programa de Rehabilitación Cardíaca

La OMS definió la Rehabilitación Cardíaca (RHC) como "conjunto de actividades necesarias para asegurar a los enfermos del corazón una condición

física, mental y social óptima, que les permita ocupar por sus propios medios un lugar tan normal como les sea posible en la sociedad”.

La prevención es el mejor de los tratamientos para las ECV y los programas de RHC han demostrado ser eficaces. Formados por un equipo multidisciplinar, son programas que actúan sobre las pautas de control de factores de riesgo a través de charlas educativas y ejercicio físico. Los objetivos de la RHC son disminuir la morbimortalidad, mejorar la calidad de vida general y sexual, los aspectos psicológicos y aumentar la tasa de reincorporación laboral.

Hay evidencia clara y suficiente de que este tipo de actuación mejora el pronóstico de esta patología, con descenso en las complicaciones y la mortalidad y que el coste-efectividad y coste-beneficio de la RHC es favorable [31].

Las recomendaciones indican que hay que incluir a profesionales especializados de todas las áreas que puedan verse afectadas. Sin embargo, tal y como apunta el experto, “el número de especialistas en disfunción sexual que trabajan en rehabilitación cardiaca es bajo”. Así lo ponen de manifiesto los datos del Registro Español de Unidades de Rehabilitación Cardiaca (R-EURCa) [32] llevado a cabo por la Sección de Riesgo Vascular y Rehabilitación Cardiaca de la Sociedad Española de Cardiología, según el cual sólo el 20,9% de los centros que imparten RHC en España cuentan con alguno de estos profesionales.

El programa de RHC se puso en marcha en el HGUDrB en el año 2008 y es en el 2017 cuando nosotros iniciamos la colaboración.

## **1.2. MARCADORES FARMACOGENÉTICOS**

La Farmacogenética es la disciplina científica orientada al estudio de los aspectos genéticos relacionados con la variabilidad de la respuesta interindividual a los fármacos, en función de las variaciones presentes en la secuencia del ADN de un individuo [33]. Las variaciones en la secuencia genética pueden influir en la forma en que un paciente reacciona a un fármaco, tanto en su eficacia como en su seguridad.

Como en todo proceso multifactorial, en la DE pueden existir componentes genéticos. Sabemos que la salud vascular desempeña un papel fundamental en

la función eréctil y que la ECV puede estar influida genéticamente, por lo que nos podemos plantear la posibilidad de que las posibles variantes genéticas implicadas en la regulación del ON puedan tener cabida en la fisiopatología de la DE e influir en la vulnerabilidad a padecer DE y en su respuesta al tratamiento con iPDE5.

Hasta la actualidad, se ha registrado información genética relevante en más de 300 fármacos, relacionada con biomarcadores que influyen en aspectos como la exposición al medicamento, la variabilidad en la respuesta clínica, el riesgo de efectos adversos, la dosificación adecuada, los mecanismos de acción y los objetivos terapéuticos específicos [34].

En este contexto, el enfoque principal de esta investigación se centró en analizar la influencia de las variaciones genéticas del gen eNOS en el campo de la DE.

### **1.2.1. Fisiopatología de la erección e implicación del gen eNOS**

Como ya se ha comentado, la DE se relaciona con la disfunción endotelial y la reducción de la biodisponibilidad de ON. La disponibilidad de ON está regulada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) usando la arginina como sustrato. Hay tres isoformas conocidas: NOS neuronal (nNOS o NOS1), NOS inducible (iNOS o NOS2) y NOS endotelial (eNOS o NOS3)

NOS endotelial (eNOS) es la involucrada en la regulación de la función vascular. La disminución en la síntesis de la eNOS o una menor actividad de ésta, se ha relacionado con la DE y otras patologías asociadas con la disfunción endotelial.

El gen que codifica para esta enzima se encuentra en el cromosoma 7q36. El polimorfismo genético se refiere a las variaciones en la secuencia de ADN que pueden ocurrir naturalmente en una población. Estos polimorfismos pueden afectar la función del gen y en algunos casos, estar asociados con susceptibilidad a ciertas patologías. En el caso del gen eNOS, se han identificado varios polimorfismos que pueden influir en la actividad de la enzima y, por tanto, en la producción de ON. Algunos de los polimorfismos más estudiados en este gen, relacionados con la disfunción endotelial y la vulnerabilidad a ECV, incluyen:



- a) **Polimorfismo G894T (Glu298Asp):** ubicado en el exón 7 del gen. La variante 894 G>T da como resultado un cambio del aminoácido glutamato por ácido aspártico en la posición 298 (Glu298Asp) de la proteína. Estudios de asociación genética han mostrado que individuos portadores del alelo Asp298 tienen una probabilidad mayor de desarrollar enfermedad arterial coronaria [35].
- b) **Polimorfismo T786C:** en la región promotora del gen. Se trata la sustitución de timina por citosina en la posición 786. Asociado con una marcada reducción en la actividad promotora del gen y bloqueo de la expresión de la enzima eNOS en un 50% [36].
- c) **VNTR intrón 4:** el número variable de repeticiones en tándem o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) son repeticiones de secuencias de 9 a 100 pares de bases. Este caso corresponde a la repetición de 27 pares de bases localizado en el intrón 4; el alelo nativo (4b) presenta la repetición de 5 veces y el alelo mutado (4a) la presenta 4 veces. El genotipo a/a se ha asociado con incremento del riesgo para enfermedad arterial coronaria [37].

Los distintos miembros de la familia NOS están codificadas por diferentes genes. Los genes que codifican eNOS se consideran factores esenciales que influyen en la DE, es decir, determinadas variantes genéticas podrían afectar a la formación de ON endógeno, incrementar la posibilidad de DE en estos pacientes y ser un elemento modulador de la respuesta a fármacos [38–41].

La idea de la investigación en la que se basa esta tesis doctoral, surgió de las dudas existentes ante la falta de respuesta de algunos pacientes a los iPDE5, pacientes no respondedores con un perfil clínico similar a los respondedores, unidas a la publicación de investigaciones sobre la posible implicación del gen eNOS en la prevalencia y en la respuesta al tratamiento con iPDE5.

Los primeros estudios evaluaban la respuesta a sildenafil en individuos con DE. El cambio de glutamato por aspartato en la posición 298 (g.894G > T) se relacionó con una menor actividad de la eNOS y con una menor respuesta a sildenafil [42]. Sin embargo, los pacientes con el genotipo del 786T > C mutado (786C), con una expresión y una actividad menor de la eNOS, respondían mejor

a sildenafil, lo que parece contradecir los resultados anteriores y la hipótesis inicial de que una mayor actividad de la eNOS y por lo tanto una mayor biodisponibilidad de ON implicaría una mayor respuesta al tratamiento con iPDE5.

En un estudio en población turca el genotipo 4 b era más prevalente en pacientes con mala respuesta, sin embargo, esta respuesta se definió únicamente como la puntuación después del tratamiento con sildenafil, sin tener en cuenta la situación inicial [42,43].

Para eNOS, los estudios de investigación se han centrado principalmente en el G894T, intrón 4 y T786C. El principal hallazgo de un meta-análisis sobre el gen G884T realizado por Dai y cols. en 2013 [44] fue que el genotipo GG y/o el alelo-G de dicho gen podría proteger a los individuos contra el riesgo de DE en los asiáticos y los caucásicos. El polimorfismo G894T se produce en diferentes frecuencias entre los diferentes grupos étnicos. En este sentido, se ha demostrado que hombres homocigotos para el alelo Asp, asociado a la menor producción de ON, obtuvieron menor respuesta al sildenafil comparados con el genotipo Glu/Glu. El alelo-C del polimorfismo T786C se asocia con mejores respuestas de los pacientes con DE postquirúrgica con sildenafil [43], mientras que el alelo 4a del intrón 4 VNTR se asocia con mejor respuesta de pacientes con DE clínica con sildenafil [45] (Tabla 3).

SNP	CAMBIO	RESPUESTA OBSERVADA	
T786C	Timina por citosina	CT/TT	-↓ 50% la actividad del promotor -↓↓↓ [NO] suero
		CC	-↑ Riesgo de DE en población turca
G894T	Glutamato por Aspartato	GG/GT	-Factor protector de DE
		TT mutante	-↓ producción basal de NO -↑ riesgo de DE
VNTR	Alelos (aa, bb, ab)	Aa	-Alteración de [NO]

Tabla 3. Variantes genéticas del gen eNOS.

### 1.3. MicroRNA COMO NUEVOS BIOMARCADORES

Los microRNA (miRNA) son microrreguladores de la expresión génica que están alcanzando gran importancia clínica por su papel cada vez más evidente en la regulación de los procesos tanto fisiológicos como patológicos. Realizan funciones de comunicación entre células a través de la circulación sanguínea y por ello, se plantea la posibilidad de utilizarlos como biomarcadores en el diagnóstico, pronóstico y/o respuesta a tratamiento.

Son pequeños ácidos ribonucleico (ARN) que no codifican para proteína. Actúan a nivel postranscripcional mediante la degradación del ARN mensajero (ARNm) o la inhibición de la traducción, disminuyendo en ambos casos la expresión del gen sobre cuyo ARNm hacen diana. Lo hace especialmente interesantes que podamos encontrarlos en células, tejidos y fluidos, lo que permite el uso de métodos no invasivos para el análisis y estudio de su expresión bajo distintas condiciones normales y patológicas [46]. En situaciones patológicas, la expresión del miRNA está anormalmente regulada (infra o sobreexpresión).

El miRNA21 es uno de los miRNA más estudiados por su relación con múltiples procesos biológicos. Aunque la mayor parte de la investigación del papel de este miRNA se ha centrado en oncología, parece que es una molécula reguladora importante en casi todos los sistemas. Se ha relacionado experimentalmente con alrededor de 300 enfermedades y se estima que tiene al menos 469 genes blanco [47].

En los últimos años, miRNA21 se ha postulado como un mecanismo clave en el desarrollo y en la funcionalidad del sistema cardiovascular, con destacado potencial como biomarcador en el síndrome coronario. La mayoría de las publicaciones se centran en el estudio de los valores de miARN en el tejido miocárdico [48]. Se identificaron en un meta-análisis algunos miRNA (miARN21, 92, 126, 132) como biomarcadores de IAM con aplicación clínica y como indicadores con alta sensibilidad y especificidad en esta patología. El perfil de miRNA circulantes parece estar asociado no sólo con la lesión coronaria, sino también con la gravedad de la misma [49].

Dada la íntima relación existente entre ECV y DE, los nuevos conocimientos sobre el rol de los miRNA en el sistema cardiovascular y la compleja y todavía parcialmente desconocida patogénesis de la DE, no es de extrañar que nos planteemos que los miRNA puedan también estar vinculados a la DE. De hecho, investigaciones recientes proponen a los miRNA como biomarcadores circulantes de DE [50]. Estudios realizados en modelos animales [51] han demostrado que la expresión aberrante de miRNA está estrechamente asociado con la DE y que los miRNA juegan un papel importante en algunos procesos clave (fibrosis del CC, apoptosis, angiogénesis y la liberación de ON) y que la sobreexpresión o la inhibición de estos miRNA condicionan la función eréctil.

La expresión de miRNA destaca como una potencial diana terapéutica en la DE. A pesar del desarrollo de esta línea de investigación en los últimos años, todavía faltan estudios que consoliden los conocimientos sobre la expresión, las funciones biológicas y los mecanismos moleculares de los miRNA en la DE.

### **1.3.1. Variabilidad individual en la respuesta farmacológica**

Los iPDE5 son el tratamiento de elección para la DE. Se recomiendan como fármacos de primera línea, pero hasta el 30 % de los pacientes fracasan con este tratamiento [52], sin que tengamos definido el perfil de pacientes no respondedores en las poblaciones que hemos estudiado. Desafortunadamente, todavía quedan aspectos desconocidos de la patogenia de la DE.

En la valoración de la respuesta a un fármaco hay que tener en cuenta todas las circunstancias que rodean al individuo, sin olvidar el factor emocional, importante condicionante en la esfera sexual. Respecto al factor genético, los genes más prometedores en el tratamiento de la DE, con implicaciones farmacogenéticas, están relacionados con la vía el ON/GMPc. Estos polimorfismos genéticos podrían ser en parte los responsables de las diferencias interindividuales en la respuesta al tratamiento con iPDE5, aunque probablemente otros genes influyan también en esta respuesta.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. HIPÓTESIS

La DE es una entidad que aparece en el seno de distintas patologías, infradiagnosticada e infratratada en muchas ocasiones. El personal facultativo de la UDO del HGUDrB de Alicante observó que la disfunción sexual referida por algunos de sus pacientes no se recogía en el registro sistemático de efectos adversos. Nuestro equipo de trabajo llevó a cabo un estudio observacional que midió la prevalencia de la DE en pacientes DCNO en tratamiento crónico con opioides que acudieron de rutina a la consulta de UDO, en el que se puso de manifiesto que el hipogonadismo y sus manifestaciones clínicas en el hombre, era un efecto adverso frecuente en el tratamiento continuo con analgésicos opioides (Proyecto OPIPAIN). Posteriormente, ante la existencia de pacientes no respondedores al tratamiento andrológico, se decidió ampliar el estudio con el análisis de marcadores genéticos (**Proyecto OPIPAIN-Gene**).

Este proyecto generó un modelo de análisis de marcadores farmacogenéticos y una derivación asistencial más ágil de los casos DE a la Unidad de Andrología. Este modelo de trabajo se amplió al programa de RHC del Servicio de Cardiología del HGUDrB, diseñándose un nuevo proyecto (**Proyecto OPICARDIO**). La ECV es una patología que nos encontramos a diario en la consulta de Andrología, estando estrechamente vinculada con la DE, tal y como se ha comentado con anterioridad. Se consideró que el estudio de marcadores genéticos podría ser útil en un diagnóstico precoz y que podría aportar más información acerca de los factores individuales implicados en la efectividad y la seguridad de la prescripción farmacológica. Se planteó la posibilidad de establecer un protocolo de detección precoz de DE que beneficiaría a nuestros pacientes evitando otras complicaciones y se propuso iniciar un estudio de factores predictivos genéticos. A esta línea, se sumó el **Proyecto OPICARDIO-miRNA**.

La hipótesis de esta tesis es que la implicación del genotipo (variantes del gen *eNOS*) en pacientes con DE y DCNO (**Proyecto 1: OPIPAIN-Gene**) y en pacientes con DE y ECV (**Proyecto 2. OPICARDIO**) y que un posible impacto funcional de la presencia de miRNA en pacientes con DE y ECV (**Proyecto 3.**

**OPICARDIO-miRNA**), permita crear protocolos clínicos con información personalizada, poder categorizar a los pacientes en diferentes grados de severidad, conocer la diferente respuesta al tratamiento con iPDE5 y así aplicar el concepto de medicina personalizada en nuestro medio. Además, este modelo de trabajo sería trasladable a otros servicios clínicos con alta prevalencia de DE o incluso a la Atención Primaria, donde la DE pueda ser evaluada como un síntoma centinela de ECV.

## 2.2. OBJETIVOS

### 2.2.1. Objetivo principal

Analizar la relevancia funcional de los polimorfismos del gen de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y miRNA circulantes en pacientes con cardiopatía isquémica y DE.

### 2.2.2. Objetivos secundarios

1. Integrar la detección de las disfunciones sexuales y en concreto de la DE, en unidades que pudieran presentar una prevalencia alta, valorando su impacto tanto en la calidad de vida sexual como en el curso de su enfermedad de base y establecer una vía clínica de derivación entre las distintas unidades.

2. Analizar la variabilidad interindividual en vulnerabilidad a presentar DE y la variabilidad en respuesta al tratamiento con iPDE5 según presencia de variantes genéticas en el gen eNOS en pacientes con DCNO (**Proyecto 1 OPIPAIN-Gene**).

2. Analizar la variabilidad interindividual en vulnerabilidad a presentar DE y la variabilidad en la respuesta al tratamiento con iPDE5 según presencia de variantes genéticas en el gen eNOS en pacientes con DE y ECV (**Proyecto 2 OPICARDIO**).

3. Describir el posible impacto funcional de la presencia de miRNA en pacientes con DE y ECV (**Proyecto 3 OPICARDIO-miRNA**).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DESARROLLO DE LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

La presente Tesis Doctoral está formada por tres proyectos que han dado lugar a cuatro artículos, como se describe a continuación:

**Proyecto 1. OPIPAIN-Gene.** Estudio paralelo de factores predictivos genéticos asociado al estudio de la DE en pacientes con DCNO con tratamiento crónico de opioides.

**Artículo 1.** *“Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and erectile dysfunction in chronic pain”*. *Gene*. 2019;721S:100005. (ANEXO I).

**Proyecto 2. OPICARDIO.** Implicación de las variantes del gen eNOS en el riesgo cardiovascular de los pacientes con disfunción eréctil.

**Artículo 2.** *“Disfunción eréctil en pacientes con enfermedad cardiovascular y potencial influencia de marcadores genéticos”* *Rev Int Androl*. 2021 Oct-Dec;19(4):217-223. (ANEXO I).

**Artículo 3.** *“Erectile dysfunction in high-risk cardiovascular patients: a prospective study of eNOS gene polymorphisms T-786C, G894T and INTRON VNTR functional interaction”*. *Andrology [en revisión]* (ANEXO II).

**Proyecto 3. OPICARIO-miRNA.** microRNAs como nuevos biomarcadores a estudio.

**Artículo 4.** *“Circulating miRNA21 is a promising biomarker for cardiovascular events in erectile dysfunction patients”*. *Frontiers in Cardiovascular [en revisión]* (ANEXO II).

Los tres proyectos se pueden revisar en el cronograma que se muestra a continuación, donde la doctoranda participó de forma activa en todas las etapas, desde la conceptualización de los mismos, diseño, aprobaciones éticas, inclusión, manejo de muestras, colaboración con el Biobanco ISABIAL, gestión de la base de datos y soporte al análisis estadístico (Figura 5).



Figura 5. Cronograma Tesis Doctoral

Todos estos proyectos se desarrollaron en el seno del **Grupo de Investigación de Neurofarmacología aplicada al dolor** (grupo NED, número 10, ISABIAL). A continuación, se describen los proyectos vinculados con un esquema de cada uno que incluye sus características, en la Tabla 4.

<b>Título del Proyecto 1</b>	<b>Estudio paralelo de factores predictivos genéticos asociado al estudio de la DE en pacientes con DCNO con tratamiento crónico de opioides (OPIPAIN - Gene).</b>
<b>Código del proyecto</b>	ASP-OPI-2017-01
<b>Promotor e IP</b>	Dra. Ana M <sup>a</sup> Segura Paños
<b>Investigadores colaboradores HGU Dr. Balmis de Alicante</b>	Dra. Ana M <sup>a</sup> Peiró. FEA Farmacología. Dr. Vicente Arrarte. FEA Cardiología. Dña. Guillermina Ferrándiz. DUE. Lda Psicología Dña. Josefa Soriano. DUE. Programa de RHC. Dña. Olga Moreno. Fisioterapeuta. Programa de RHC.
<b>Fecha de aprobación del CEIC/CEIm</b>	24/04/13 (ANEXO III)



<b>Título del Proyecto 2</b>	<b>Implicación de las variantes del gen eNOS en el riesgo cardiovascular de los pacientes con disfunción eréctil (OPICARDIO)</b>
<b>Código del proyecto</b>	ASP-OPI-2017-01
<b>Promotor e IP</b>	Dra. Ana M <sup>a</sup> Segura Paños
<b>Investigadores colaboradores</b> <b>HGU Dr Balmis de Alicante</b>	Dra. Ana M <sup>a</sup> Peiró. FEA Farmacología. Dr. Vicente Arrarte. FEA Cardiología. Dña. Guillermina Ferrándiz. DUE. Lda Psicología Dña. Josefa Soriano. DUE. Programa de RHC. Dña. Olga Moreno. Fisioterapeuta. Programa de RHC.
<b>Fecha de aprobación del CEIC/CEIm</b>	27/06/17 (ANEXO III)

<b>Título del Proyecto 3</b>	<b>Implicación de las variantes del gen eNOS en el riesgo cardiovascular de los pacientes con disfunción eréctil (OPICARDIO-microARN)</b>
<b>Código del proyecto</b>	PI2022 – 114
<b>Promotor e IP</b>	Laura Agulló Antón
<b>Investigadores colaboradores</b> <b>HGU Dr Balmis de Alicante.</b>	Dra. Ana María Peiró. FEA Farmacología. Dr. Vicente Arrarte. FEA Cardiología. Dña. Josefa Soriano. DUE. Programa de RHC. Dña. Olga Moreno. Fisioterapeuta. Programa de RHC.
<b>Fecha de aprobación del CEIm</b>	18/10/22 (ANEXO III)

*Tabla 4. Información y actividades resumidas de cada uno de los tres proyectos que conforman la presente Tesis Doctoral.*

### 3.2. VARIABLES RECOGIDAS

Las variables recogidas durante el desarrollo de los proyectos que conforman la Tesis Doctoral fueron las siguientes:

- a) Sociodemográficas
- b) Clínicas y psicosociales: cuestionarios

Escala Visual Analógica (EVA). En los pacientes del grupo DCNO, la intensidad del dolor fue determinada con esta escala, empleando 0 “ausencia de dolor” y 10 “el peor dolor posible” y catalogándose el dolor como ligero ( $\leq 3$  cm), moderado (4 - 6 cm) y de severo (7 – 10 cm).

Índice Internacional de Función Eréctil (IIEF). Para objetivar la sintomatología referida por el paciente y medir el grado de DE podemos apoyarnos en cuestionarios. El IIEF se desarrolló como una herramienta confiable y autoadministrada, con sensibilidad y especificidad para diagnosticar y valorar los cambios relacionados con el tratamiento en pacientes con DE [53]. Aborda los cinco dominios de la función sexual masculina (función eréctil, función orgásmica, deseo sexual, satisfacción sexual y satisfacción general) y ha sido validado en distintos idiomas. Tras su validación, se ha adoptado como la medida patrón de referencia en entornos clínicos o de investigación. La subescala de función eréctil (IIEF-FE) tiene un rango de 0 a 30 puntos, clasificándose la DE como severa (0 - 10 puntos), moderada (11-16 puntos), leve (17 - 25 puntos), y sin DE ( $\geq 26$ ) (ANEXO IV).

Cuestionario de Calidad de vida Sexual modificado (mSLQQ: (Sexual Life Quality Questionnaire) [54] Evalúa la satisfacción sexual y la satisfacción con el tratamiento. Consta de 10 ítems. Una puntuación de 0 indica que no hay cambios, una puntuación negativa ( $<0$ ) y positiva ( $> 0$ ) puntos indican empeoramiento o mejoría respectivamente (ANEXO IV).

Escala de ansiedad y depresión hospitalaria (HAD: Hospitality Anxiety and Depression Scale) [55,56]. Cuestionario autoaplicado de 14 ítems con 2 subescalas de 7 ítems cada una, en escala Likert 0-3. HAD ítems impares, HAD ítems pares, con rango de puntuación en cada subescala de 0-21. Mayor puntuación, mayor ansiedad y depresión. Para ambas subescalas las

puntuaciones por debajo de siete se consideran "no caso", mayores de ocho se consideran "caso probable" y superiores a once indican "caso" (ANEXO IV).

Cuestionario Impresión Clínica Global (ICG) [57]. A cumplimentar en la visita final. Refleja cómo se encuentra el paciente comparado con el estado inicial: ¿Cómo se encuentra en estos momentos? (0: No evaluado; 1: Mucho mejor; 2: Moderadamente mejor; 3: Levemente mejor; 4: Sin cambios; 5: Levemente peor; 6: Moderadamente peor; 7: Mucho peor) (ANEXO IV).

#### c) Analíticas

Se realizaron analíticas sanguíneas o se recuperaron los datos de analíticas recientes de los últimos seis meses. De forma sistemática, según las guías de recomendación se realizó hemograma y bioquímica general. Dependiendo del paciente y de la sospecha clínica, se solicitaron otras determinaciones complementarias.

#### d) Datos genéticos

Para el análisis de los polimorfismos se recogieron 2 mL de saliva en tubos con 6 mL de solución salina. Tras la extracción del ADN de las muestras, se procedió a la determinación de las variantes genéticas T-786C (rs2070744) y G894T (rs1799983) del gen *eNOS* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR: Real Time-Polymerase Chain Reaction) con sonda TaqMan.

Para el análisis de miRNA se recogieron muestras de sangre completa en vacutainers que contenían EDTA. Tras centrifugación de las mismas para la separación del plasma, se congelaron y almacenaron hasta el aislamiento del ARN. La presencia de MiRNA21 se determinó con la técnica RT-PCR.

Se analizaron los datos según su perfil genético de predicción de respuesta al tratamiento con iPDE5.

### **3.3. ASPECTOS ÉTICOS**

#### **3.3.1. Consideraciones generales**

Los tres proyectos que conforman la presente Tesis Doctoral se llevaron de acuerdo al Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, la Declaración de Helsinki (revisión 2013), las normas de Buena Práctica Clínica y la legislación vigente en España (orden ministerial SAS/3470/2009) relativa a la realización de estudios con muestras biológicas. Estos proyectos se adhirieron a las guías STROBE de estudios observacionales.

Todos los pacientes incluidos en el estudio leyeron y entendieron la hoja de información al paciente y firmaron el consentimiento informado. Para la recogida de la muestra biológica firmaron el consentimiento de donación al biobanco del HGUDrB para el almacenamiento del excedente de la muestra. Toda participación fue voluntaria, dando la posibilidad a los participantes de revocar su consentimiento en cualquier momento, sin necesidad de dar ninguna explicación al respecto y sin que supusiera ningún detrimento en su seguimiento clínico. Para estos casos, se empleó el documento denominado “revocación del consentimiento informado”.

Toda la información recogida del paciente se trató según la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (24 de octubre de 1995), relativa a la protección de personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales, y a la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y el Real Decreto 1720/2007, del 21 de diciembre. Además, todos los datos se registraron en una base de datos electrónica, anonimizada, específica y exclusiva del estudio.

Los proyectos de este tipo de estudios deben someterse a revisión por un comité independiente. Por ello, los proyectos fueron evaluados por el CEIC/CEIm del HGUDrB, siendo aprobados por el mismo (ver ANEXOS III).

### **3.3.2. Beneficios y riesgos potenciales para los pacientes**

Pueden no existir beneficios potenciales para los pacientes participantes en estos estudios. Sin embargo, el mayor conocimiento acerca de los factores pronósticos y predictivos de la eficacia y toxicidad y de posibles biomarcadores, podrá facilitar en un futuro el tratamiento individualizado para cada paciente, aumentando las posibilidades de éxito y minimizando el impacto de los efectos secundarios.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. PROYECTO 1: OPIPAIN-Gene

La DE es un efecto adverso prevalente y poco diagnosticado en los hombres con DCNO en tratamiento crónico con opioides. Nuestros resultados mostraron que los polimorfismos del gen eNOS pueden impactar en la severidad de la DE y la respuesta al tratamiento en los pacientes con DCNO, observándose una tendencia del polimorfismo T786C a una mejor respuesta al tratamiento.

De los 125 pacientes ( $57.9 \pm 11$  años) que referían disminución de la libido y/o DE, inicialmente reclutados, se confirmó el diagnóstico de DE en 84 pacientes (67%) y finalizaron el estudio 69 pacientes (82%). Todos ellos de etnia caucásica, con una media de 5.5 años en la duración del tratamiento crónico con opioides y una intensidad basal del dolor moderada (EVA:  $5,7 \pm 2,5$  cm), características representativas de los pacientes que habitualmente son atendidos en las consultas de UDO de nuestro hospital (**Artículo 1**; ANEXO I).

La valoración en la consulta de Andrología evidenció que la mayoría de los pacientes, en su visita basal, presentaban un grado severo de DE (73%), según la puntuación obtenida con el dominio IIFE-FE y una baja percepción de su calidad de vida sexual según la puntuación obtenida con el cuestionario mSLQQ. Se instauró tratamiento con iPDE en el 28% de los casos, con testosterona en el 43% y con la asociación de ambos en el 28% de los casos.

Al finalizar el estudio, tras seis meses de tratamiento, se observó una mejoría clínica significativa en la función eréctil (IIEF basal  $26 \pm 14.7$  vs  $45.9 \pm 20.1$  puntos final;  $p < 0.001$ ; IIEF-FE basal  $8.6 \pm 6.9$  vs  $18.6 \pm 9.8$  puntos final;  $p < 0.001$ ) y la calidad de vida (mSLQQ basal  $19.8 \pm 16$  vs  $54.3 \pm 26$  puntos final;  $p < 0.001$ ).

Las frecuencias de los alelos T786C-C y alelo G894 T-G fueron 57.1% y 61,5% respectivamente. El análisis de la interacción de los polimorfismos genéticos con la respuesta clínica fue significativamente mejor en pacientes T786C-CC. ( $p = 0.029$ ), aunque se observó mejoría clínica en todos los pacientes, independientemente del genotipo. No se encontró asociación entre el genotipo y la mejoría en la calidad de vida sexual. Todos los pacientes excepto

uno fueron b/b para el intrón 4 VNTR, por lo que no se analizó la influencia del genotipo 4VNTR.

## 4.2. PROYECTO 2: OPICARDIO

Pretende explorar el posible impacto que podrían tener las variantes del gen *eNOS* en la DE y en la respuesta al tratamiento con iPDE5, para lo que seleccionamos pacientes DE y cardiopatía isquémica del programa de RHC.

Los resultados obtenidos inicialmente (**Artículo 2**; ANEXO I) mostraron una tendencia a una mejor respuesta al tratamiento con iPDE5 según el genotipo de los pacientes con DE y ECV. Para poder confirmar estos resultados decidimos ampliar la muestra y profundizar en la idea de las variantes del gen *eNOS* como marcadores farmacogenéticos (**Artículo 3**; ANEXO II). Encontramos una asociación significativa entre la variante 786-TT y aa/ac del intrón 4 VNTR, con una mayor vulnerabilidad a la DE pero sin evidenciarse el impacto de los polimorfismos de este gen en la respuesta al tratamiento, ya que nuestros pacientes respondían al tratamiento con iPDE5 independientemente de su genotipo.

Los 35 pacientes incluidos inicialmente para el estudio ( $60,8 \pm 8,44$  años) presentaban una DE severa según el dominio IIEF-FE (IIEF-FE  $9,4 \pm 6,73$  puntos) y una baja percepción de su calidad de vida sexual (mSLQQ  $-19,4 \pm 8,37$  puntos). En el momento de la publicación se había realizado el análisis genético en 27 pacientes y completaron el estudio 15 (42.8%).

A todos los pacientes se les prescribió iPDE5, observándose una mejoría significativa de su DE, con un cambio en la puntuación de la mediana del dominio IIEF-FE de 10,5 puntos. Sin embargo, la diferencia en la puntuación de la escala IIEF y IIEF-FE entre la visita basal y final no fue significativa. Hubo una tendencia a mejor respuesta clínica entre los genotipos 786-TT (100% respondedores) y el 864-TT (100% respondedores), sin ser significativas, quizás debido al pequeño tamaño muestral.

Se amplió la muestra, incluyéndose 112 pacientes ( $60 \pm 9$  años, 100% caucásicos) con una fracción de eyeción media del 56% en el momento de la

inclusión y un tiempo medio desde el evento CV de  $7 \pm 6.7$  años. El 66% de los pacientes se clasificaron como DE severa según la puntuación obtenida en el subdominio IIEF-FE del cuestionario IIEF, obteniendo también una baja puntuación en el cuestionario mSLQQ ( $27 \pm 13$  puntos), lo que implica una pobre percepción sobre su calidad de vida sexual. En la mayoría de estos pacientes existían comorbilidades asociadas a RCV (dislipemia, HTA, Tabaquismo, DM y obesidad).

Nuestros datos mostraron que en el 50% de los casos, la aparición de la DE fue anterior al evento CV, en el 38% de los casos la primera manifestación clínica fue el ECV, siendo este debut más frecuente en pacientes con obesidad y en los fumadores. En el 12% de los casos, DE y ECV se manifestaban al mismo tiempo. Objetivamos también correlación entre edad-DE-ECV, existiendo una correlación lineal en los pacientes que debutaron con DE.

En la vista final, a los tres meses de tratamiento con iPDE5, se objetivó una mejoría significativa de la función eréctil (IIEF basal  $33 \pm 13$  vs  $50 \pm 16$  puntos final;  $p < 0.001$ ) (IIEF-EF basal  $10 \pm 6$  vs  $21 \pm 10$  puntos final;  $p < 0.001$ ) y de la percepción sobre la calidad de vida sexual (mSLQQ basal  $27 \pm 13$  vs  $54 \pm 24$  puntos final;  $p < 0.001$ ). Los niveles de ansiedad y depresión (cuestionario HAD) denotaron que no existía deterioro significativo de la salud mental ni antes ni después del tratamiento andrológico.

La frecuencia de los genotipos T786C y G894T fue del 20% y del 46% respectivamente y el alelo a del intrón 4 VNTR estaba presente en 16% de los casos. El grado de severidad de la DE era significativamente mayor en aquellos pacientes portadores de los genotipos 786-TT y aa/ac del intrón 4.

Analizando más a fondo la interacción de los polimorfismos del gen *eNOS* con la respuesta clínica al tratamiento con iPDE5, observamos que estos genotipos no condicionaron significativamente esta respuesta. Sin embargo, los polimorfismos de G894T mostraron una ligera influencia ( $p = 0,076$ ) en la de la fracción de eyección, lo que podría merecer análisis futuros.



### 4.3. PROYECTO 3. OPICARDIO-miRNA

Los miRNA son pequeñas moléculas que regulan la expresión génica y las que, cada vez hay mayor evidencia de su implicación en distintos procesos fisiopatológicos, incluido el mecanismo de la erección. Este trabajo pretende identificar el perfil de miARN21, por su asociación a ECV, en pacientes con ECV y DE, en comparación con función eréctil y/o estado CV normal.

Se trata de un estudio piloto caso- control, observacional, que investiga el impacto de estos marcadores en sujetos provenientes del programa de RHC. Se dividieron en 3 grupos (**Artículo 4**; ANEXO I):

- controles: grupo 1- pacientes con DE sin ECV (20 pacientes;  $60 \pm 12$  años) y grupo 2- pacientes con ECV sin DE (16 pacientes;  $50 \pm 5$  años)
- casos: grupo 3 - pacientes con DE y ECV: 29 pacientes ( $63 \pm 9$  años; DE severa [IIEF  $34 \pm 15$  puntos; IIEF-FE  $11 \pm 6$  puntos])

Se obtuvieron diferencias significativas en los valores de expresión de miRNA21 entre los 3 grupos. La expresión de los niveles séricos de miRNA21 de los pacientes del grupo 3 (casos) fue hasta 10 veces más baja ( $p = 0,0368$ ,  $\beta = -2,046$ ) que en el grupo 1 (control DE sin ECV). Los pacientes con ECV (grupo 2) presentaron niveles significativamente más bajos de expresión de miRNA21 en comparación con los otros dos grupos ( $p = 0,0368$ ,  $\beta = -2,046$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos control (pacientes con ECV y ECV y ED;  $p = 0,5$ ). Los análisis de regresión lineal mostraron una asociación inversa entre los valores de expresión de miRNA21 y la prevalencia de DE ( $p = 0,0368$ ,  $\beta = -2,046$ ).

## 5. DISCUSIÓN

El proyecto busca el objetivo común de analizar la implicación de variantes genéticas del gen *eNOS* y de miRNA en los pacientes con DE y ECV, así como generar vías de colaboración clínica afines a la Unidad de Andrología, como son la UDO y el Programa de RHC, lo que propone un cambio de modelo asistencial. Esto es relevante porque las disfunciones sexuales conllevan sentimientos de vergüenza, lo que dificulta y retrasa su diagnóstico [58]. De hecho, el estudio de biomarcadores potencialmente trasladables a la práctica clínica, posibilitaría identificar poblaciones con una vulnerabilidad diferente a presentar DE o a tener una mejor respuesta terapéutica al manejo andrológico. La posibilidad de que con los conocimientos obtenidos podamos desarrollar modelos que permitan anticiparse a la aparición de determinadas condiciones o enfermedades y poder adecuar el manejo clínico del paciente, supondría un beneficio a nuestro sistema nacional de salud (SNS).

Una aportación clínica clara de este trabajo, ha sido la incorporación de la anamnesis sobre salud sexual en las consultas de estas unidades especializadas, implicando a los profesionales facultativos en la asistencia al paciente con DE, lo que impacta positivamente sobre su calidad de vida sexual.

### 5.1. DE COMO SÍNTOMA CENTINELA EN LA ECV

La DE es una patología prevalente, con importante repercusión en la calidad de vida del paciente y su pareja. Además del impacto emocional, hay que destacar su impacto sobre la salud general y principalmente cardiovascular. Es en ocasiones, la primera manifestación de patologías subyacentes no diagnosticadas previamente, por lo que actualmente se acepta que la DE es un marcador de salud o síntoma centinela, predictor del desarrollo de ECV, lo que nos ofrece la oportunidad de realizar cribados para prevención

Esta aceptado que la DE debe considerarse manifestación de arteriosclerosis e incluirse en los algoritmos de estratificación de riesgo cardiovascular. Un hombre con DE sin síntomas cardíacos es un paciente con una enfermedad cardíaca o vascular hasta que se demuestre lo contrario [27]. En nuestro caso, hasta en un 50% de los casos la DE se manifestaba de modo

previo a la ECV, siendo una oportunidad –eficiente y efectiva- de poder indagar en sus factores de riesgo CV. Además, la diferente expresión del miRNA21 en estos dos grupos de población (casos y controles) permitiría incorporar este marcador biomolecular en la medicina cardiovascular, hecho que se discutirá más adelante.

Ante la dificultad inicial de abordar la disfunción sexual en la consulta de la primera colaboración clínica con la UDO, se diseñó una planilla a cumplimentar por los pacientes en la sala de espera y así poder explorar la DE (disfunción sexual, disminución del deseo sexual). Esto generó una nueva herramienta validada de *screening* precoz incorporada en la cartera tecnológica de ISABIAL (ver: [tps://isabial.es/innovacion-resultado/cartera-tecnologica](https://isabial.es/innovacion-resultado/cartera-tecnologica)) que ha facilitado las interconsultas con la Unidad de Andrología.

## 5.2. CIENCIAS ÓMICAS APLICADAS A LA DE

Del mismo modo, se ha pretendido evaluar la necesidad clínica de disponer de herramientas que nos permitan anticipar el riesgo de desarrollar ECV en una sociedad que tiende al envejecimiento, en la que el número de pacientes con estas patologías, asociadas o no a otras comorbilidades y el uso de iPDE5 en el tratamiento de la DE, ha aumentado de forma considerable en los últimos años. En este sentido, en los últimos años, el interés por los marcadores genéticos ha ido en aumento, conociéndose polimorfismos y miRNA vinculados a patologías específicas. Es importante destacar que los estudios sobre estas asociaciones a menudo han arrojado resultados contradictorios. La genética es solo uno de los muchos factores que contribuyen a la vulnerabilidad a padecer enfermedades, en su rica interacción con otros factores ambientales, como pueden ser los sociopsicológicos, que también juegan un papel crucial.

**Al analizar la aplicabilidad de la genética en la clínica en nuestra muestra, aunque parece existir cierta vulnerabilidad a la DE según el genotipo, no se ha observado un impacto mayor sobre la respuesta al tratamiento andrológico.** Los datos obtenidos en estos estudios no son suficientes para apoyar el uso de los polimorfismos del gen eNOS ni los miRNA como marcadores de DE. Sin embargo, los niveles de miRNA si podrían ser útiles

en el Programa de RHC puesto que pueden orientar a un daño miocárdico y deberían ser analizados en una mayor profundidad. En este sentido, se deberían abrir otras líneas de trabajo que, por ejemplo, incluyeran a mujeres con la misma ECV y determinar los niveles de este miRNA.

### 5.2.1. Farmacogenética aplicada al tratamiento andrológico

La relación existente entre el gen *eNOS* y el DCNO no ha sido objeto frecuente de investigación. De hecho, este estudio fue uno de los primeros que relacionó estas dos entidades. Nuestros resultados evidencian la mejoría de la función eréctil y de la calidad de vida sexual de esta población con el tratamiento andrológico con iPDE5 y/ tratamiento hormonal sustitutivo con testosterona, sobre todo en pacientes portadores del genotipo T786C-CC.

La enzima eNOS está involucrada en la producción de ON, molécula que desempeña un papel crucial en la regulación del tono vascular y la función endotelial. Sabemos que algunas variantes alélicas del gen *eNOS* pueden afectar sus niveles de expresión. El polimorfismo más estudiado es el G894T que conduce a una disminución de la actividad enzimática, una disminución de la producción basal de ON y un 20% de menor actividad [59]. Estos datos concuerdan con los publicados por Gao y cols., 2004 [60], quienes tras la realización de un meta-análisis, observan un mayor riesgo de DE asociado al genotipo G894T-GG. Otras publicaciones sugieren que este genotipo influye en la vulnerabilidad de la DE en población asiática pero no caucásica.

En nuestro estudio no se observaron diferencias para este polimorfismo G894T ni en la vulnerabilidad a la DE ni en respuesta al tratamiento. Nuestros datos sugieren que el polimorfismo T786C está estrechamente asociado con mayor riesgo de DE, siendo los pacientes portadores de este genotipo los que, además, presentaban un grado más severo de DE. Estos resultados se ven apoyados por otras publicaciones [61]. En un estudio de casos y controles, con 112 pacientes con DE y 156 individuos sanos, los portadores del genotipo T786C mostraban función eréctil peor que los no portadores (IIEF-FE  $8,2 \pm 4,5$  vs  $12,2 \pm 5,0$  puntos;  $p < 0,015$ ).

Los pacientes con DE y DCNO con genotipo T786C-CC presentan el grado de más severo de DE, siendo por otro lado los que mejor responden al tratamiento. No pudimos estudiar la influencia del polimorfismo 4VNTR, ya que prácticamente la totalidad de la muestra era variante b/b, siendo esta variante la que parece presentar mayor asociación con el riesgo de DE [62].

Si bien existen investigaciones que sugieren una fuerte asociación entre las variantes del gen eNOS y DE, esta relación no está completamente aclarada y merece más esfuerzos. **Parece existir una relación entre la presencia de determinados polimorfismos de eNOS y la vulnerabilidad a padecer DE, pero no disponemos de datos que apoyen la influencia de estas variantes genéticas en la respuesta al tratamiento con iPDE5, ya que estos fármacos consiguen altas tasas de respuesta independientemente del genotipo.**

Partiendo de la hipótesis de que la farmacogenética podría ser relevante en relación con los iPDE5 para conocer el perfil de los no respondedores a estos fármacos y poder incluir estas variantes del gen eNOS como marcadores farmacogenéticos, pusimos en marcha este proyecto en pacientes con cardiopatía isquémica y DE.

Los primeros resultados en el análisis respecto a vulnerabilidad a presentar DE, analizando la edad de instauración de la DE y la edad de instauración del ECV, no evidenciaron una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos según el genotipo. Con los análisis posteriores realizados, ampliando el tamaño muestral, podemos afirmar que si existe correlación entre la edad de instauración de la DE y el ECV y que en nuestra población la DE se comporta como síntoma centinela, precediendo al ECV en el 50% de los casos. Encontramos una asociación significativa entre el polimorfismo 786-TT y aa/ac del intron 4 VNTR, con una mayor vulnerabilidad a la DE.

Ya se había publicado una asociación significativa de T786C y G894T con susceptibilidad a la DE de origen vascular [63], por lo que la posibilidad de entender la disfunción endotelial a través de variantes del gen eNOS y su posible implicación en las ECV, lo apuntaba como un biomarcador prometedor [64].

Algunas investigaciones sugieren que ciertos polimorfismos en el gen eNOS podrían afectar la eficacia de los iPDE5 en el tratamiento de la DE, pero

esta relación no está completamente establecida. Los estudios farmacogenéticos publicados, sobre todo con sildenafil, han mostrado resultados contradictorios respecto a la expresión de las variantes y la biodisponibilidad de ON [42]. Al analizar la interacción de los polimorfismos del gen *eNOS* con la respuesta clínica, nuestros resultados iniciales mostraron una tendencia a una mejor respuesta entre los genotipos homocigoto nativos 786-TT y el 864-TT, sin ser significativas entre los distintos genotipos, lo que pensamos podía ser debido al pequeño tamaño muestral. Sin embargo, desestimamos esta tendencia, ya que los resultados finales demostraron que la tasa de respuesta al tratamiento con iPDE5 era alta pero no condicionada por el genotipo.

Otro dato a destacar es que los polimorfismos de G894T mostraron una ligera influencia ( $p=0,076$ ) en la de la fracción de eyección, lo que podría merecer análisis futuros.

**El estudio de la farmacogenética es un campo en evolución y se requiere de más investigación para comprender mejor cómo los factores genéticos contribuyen a la susceptibilidad al dolor crónico y a la ECV, y como todo esto podría traducirse en enfoques más efectivos para el manejo farmacológico.**

### **5.2.2. miRNA en el paciente con DE y/o ECV**

El papel de los miRNA se ha hecho más evidente en un amplio abanico de enfermedades multifactoriales, por lo que también podría existir una implicación de estos mecanismos en la DE. Además, varias publicaciones proponen los miRNA como candidatos a biomarcadores de enfermedad coronaria, con algunos resultados prometedores [65]. El conocimiento de que hay miRNA que se expresan específica y exclusivamente en un tejido (por ejemplo: miocardio) o sólo en determinadas condiciones (por ejemplo: IAM) y que pueda ser medido en muestras circulantes, ha impulsado la investigación en este campo.

Existen miRNA vinculados con entidades como la arteriosclerosis. Dado que la DE implica una serie de procesos relacionados en los CC, es plausible que los miRNA puedan tener un papel en el tejido eréctil. La investigación sobre

el papel de los miRNA en la DE está en una fase inicial, pero algunos estudios, sobre todo con modelos animales, sugieren que podrían tener un papel protagonista. En un estudio realizado en tejido eréctil de rata, observaron que los miARN expresados anormalmente se asociaron con disfunción endotelial y fueron factores esenciales que afectaron la función eréctil en ratas de edad avanzada. Se ha descrito la expresión alterada de distintos miRNA en tejido eréctil de rata y ratón, con más o menos relevancia en función de la etiología de la DE [51].

La investigación sobre miRNA en ECV está fundamentalmente dirigida a enfermedad coronaria. Son numerosos los estudios que proponen miARN como biomarcadores circulantes que incluso pudieran tener propiedades superiores a los indicadores cardíacos convencionales utilizados actualmente en la práctica clínica [49]. En nuestro estudio, los niveles séricos de miRNA 21 de los pacientes fue hasta 10 veces más baja que en los controles. Estos datos preliminares apoyan el interés clínico a contemplar los miRNA como nuevos biomarcadores no invasivos, que permitan mejorar la prevención de la ECV; los factores de riesgo tradicionales no siempre explican el riesgo, ya que gran parte de los eventos ocurren en pacientes con un riesgo teórico bajo o intermedio [66].

Resaltar que **todavía no se conocen adecuadamente las relaciones entre los distintos polimorfismos y que la identificación de factores predisponentes, incluidos los miRNA cruciales para disponer de dianas moleculares específicas y diseñar tratamientos eficaces, seguros y por tanto, efectivos.**

## 6. LIMITACIONES Y ANÁLISIS DAFO

Una vez finalizada la presente Tesis, se debe analizar cómo ha sido su desarrollo e identificar las posibles Debilidades, Amenazas, Fortalezas y Oportunidades que presenta el trabajo realizado para ser consciente de ello y mejorar aquellos puntos débiles que hayan podido surgir, y a su vez, aprovechar las oportunidades o posibles avances.

### **Debilidades:**

1. Sesgo en la selección de pacientes. La falta de aleatorización puede suponer un problema y plantea dudas sobre posibles sesgos:

- se utilizó una “muestra de conveniencia” de pacientes que acudían al programa de RHC. Esto puede afectar a la representatividad de la población total, especialmente en los posibles genotipos, lo cual puede condicionar la capacidad para detectar diferencias estadísticamente significativas.

- el tamaño muestral es pequeño y eso conlleva a número reducido de sujetos en algunos grupos de genotipos; además en las dos poblaciones estudiadas se observan pérdidas de seguimiento o abandono del proceso. En el grupo de DCNO la causa más importante fue la limitación que suponía el dolor para las relaciones sexuales, por lo que se pospuso hasta que tuvieran mejor estado general. En el grupo de ECV el abandono fue por no respuesta al tratamiento, incidencias médicas surgidas por comorbilidades, falta de colaboración de la pareja e incluso un exitus. La adherencia al tratamiento andrológico debería reevaluarse y podría ser fruto de un proyecto específico. - existen pacientes polimedcados y algunos de los fármacos tienen efecto sobre la función eréctil, instaurados tras el ECV o por la coexistencia de otras patologías para las que ya recibían tratamiento. Este hecho puede ser un factor de confusión.

2. No se analizaron patologías previas no relacionadas con la ECV. Estos factores podrían influir en nuestros resultados, como las variables clínicas o la adherencia al tratamiento, por lo que deben tenerse en cuenta para estudios posteriores.



3. Escasa financiación que ha recibido para su desarrollo, lo que ha supuesto la búsqueda de alianzas externas, tanto públicas como privadas, para poder avanzar en las investigaciones.

#### **Amenazas:**

1. Pandemia COVID-19. La epidemia de COVID-19 fue declarada por la OMS una emergencia de salud pública de preocupación internacional el 30 de enero de 2020. En España el estado de alarma se declara el 14 de marzo, prorrogándose hasta el 21 de junio de 2020. Tuvieron que pasar unos meses para que normalizáramos nuestra asistencia hospitalaria habitual, lo que retrasó de forma muy importante la inclusión de los pacientes en estos estudios y ha limitado el tamaño muestral.

2. Barreras surgidas para la implementación de la farmacogenética. Uno de los objetivos que perseguía esta tesis es ayudar en su implementación como una herramienta más en la práctica clínica. Actualmente son pocas las empleadas en la práctica asistencial, limitadas a unos pocos genes, por lo que aún se deben de realizar grandes esfuerzos.

3. Situación precaria de la investigación a nivel nacional, debida en gran parte a la escasa financiación, lo que supone un freno a las investigaciones.

#### **Fortalezas:**

1. Son estudios realizados en el mundo real, es decir, en un ambiente clínico y con pacientes que acuden de manera rutinaria a nuestras consultas. Esto es destacable ya que, al fin y al cabo, cuando se realiza una investigación se pretende extrapolarla a nuestra rutina, cosa que no sucede en investigaciones como los ensayos clínicos. Por ello, los resultados obtenidos en estas investigaciones son de gran valor, ya que reflejan lo que sucede cuando no se controlan la mayoría de las variables.

2. Los estudios de esta tesis se han realizado desde una perspectiva personalizada, es decir, llevando a cabo un análisis genético. Los resultados obtenidos permiten tener una mayor comprensión de la influencia que pueden

ejercer factores individuales sobre el tratamiento, como pueden ser las diferencias genéticas en ciertos genes clave.

3. Los resultados obtenidos con los proyectos de investigación, a lo largo de estos años se han presentado en cursos, congresos, seminarios, jornadas, talleres y/o simposios del ámbito de la Andrología y dolor. Actualmente se plantea una colaboración internacional con la psicóloga social de *Instituto Universitário de Lisboa é uma Universidade Portuguesa* ISCTE, la Dra Sónia Bernardes para indagar otros determinantes sociales. Se plantea un estudio abordando las diferentes masculinidades y su impacto en la adherencia y efectividad del manejo farmacológico.

### **Oportunidades:**

1. Los datos obtenidos en estos estudios son de pacientes que acuden al HGUDrB, por lo que podemos extrapolarlos a la mayoría de nuestra población, por ser una muestra representativa de la misma.

2. Con los resultados obtenidos en los trabajos de nuestro grupo de investigación, se pretende implementar aquellos marcadores genéticos con alto nivel de evidencia en las guías terapéuticas como una nueva herramienta en la práctica clínica.

3. Gracias a la experiencia acumulada por las distintas líneas de investigación del grupo de trabajo, en el año 2022 se puso en marcha la **Plataforma de Farmacogenética Aplicada a la Investigación (ISABIAL)**, desde donde se colabora con el Instituto de Investigación La Fe de Valencia (Proyecto SESGEN OMIC, 2022) y la Universidad de Bolonia, Italia (Proyecto. PKditos, 2023). El objetivo es ofrecer, a otros grupos de investigación, un servicio de análisis de los biomarcadores farmacogenéticos y epigenéticos, con el fin de favorecer el desarrollo de terapias que utilicen esta información para comprender las características únicas de cada paciente, y así adaptar los tratamientos de manera más efectiva.

## 7. LÍNEAS FUTURAS

1. Implementar este modelo de estudio en Atención Primaria y/o en otras especialidades, fomentando la exploración de las disfunciones sexuales como marcador de salud y ampliando y facilitando la derivación de los pacientes a las Unidades de Andrología. Este estudio sería extensible a las mujeres

2. Crear un grupo control de pacientes con DE de más de cinco años de evolución (tiempo medio estimado entre la instauración de la DE y la del ECV) sin ECV para un seguimiento a largo plazo y así poder valorar el impacto de los marcadores genéticos en la DE como síntoma centinela en aquellos que experimenten enfermedad (factor predictivo independiente).

3. Plantear estudios multicéntricos con la finalidad de obtener un mayor tamaño muestral que permita una mayor potencia estadística y poder confirmar nuestros resultados y conclusiones.

4. Explorar otros marcadores del gen *eNOS*. Existen otros polimorfismos menos estudiados que también se han relacionado con la vía ON/GMPc y con el metabolismo de los iPDE5, pudiendo ofrecer éstos nuevas líneas de investigación.

5. Incluir otras ciencias ómicas, como los patrones de metilación del gen *eNOS*.

6. Realizar un barrido más amplio de miRNA. Nuestros datos están en la línea de publicaciones recientes que sugieren que los miRNA son un buen marcador de ECV y particularmente de enfermedad coronaria, lo que abre una nueva vía de colaboración e investigación con el Servicio de Cardiología.



## 8. CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido implementar con éxito una vía de derivación clínica entre la UDO, el Servicio de Cardiología y la Unidad de Andrología del HGUDr Balmis de Alicante, favoreciendo el diagnóstico de la DE y el tratamiento de estos pacientes, así como una mejora en su calidad de vida sexual.

Nuestra experiencia apoya su implementación tanto en la Atención Primaria como en otros servicios de Atención Especializada. Entender la disfunción sexual como una oportunidad para la intervención precoz en otras patologías debe ser un objetivo del profesional de la salud.

2. Las variantes del gen *eNOS* podrían modificar la vulnerabilidad interindividual a presentar DE e influir en la respuesta al tratamiento andrológico (iPDE5 y/ o tratamiento hormonal sustitutivo con testosterona). Los pacientes con DCNO portadores del genotipo 786-CC presentaron un mayor grado de severidad de DE en la visita basal, logrando una respuesta significativamente mayor frente al resto de genotipos *eNOS* al tratamiento.

3. Los pacientes con ECV manifestaron en el 62% de los casos DE de instauración previa o concomitante. Así mismo, se observó una asociación significativa entre el genotipo del gen *eNOS* 786-TT y el alelo aa/ac del intrón 4 VNTR, con mayor susceptibilidad a padecer DE. Por todo ello, se debería analizar la DE como factor predictivo independiente de la ECV, así como el impacto funcional del genotipo *eNOS*.

4. Tras el tratamiento andrológico, los pacientes con ECV y ED presentaron una mejoría significativa en la función eréctil y en la calidad de vida, con una tasa de respuesta del 71%, sin impacto de las variantes genéticas del gen *eNOS*. Sin embargo, la fracción de eyección cardiaca se vio influenciada positivamente con la mejora de la calidad de vida sexual y por el polimorfismo G894T de *eNOS*, lo que podría merecer análisis futuros.

5. Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de miRNA21 entre pacientes casos (ECV y DE) y controles, con una relación inversa entre la expresión de miRNA21 y la presencia de DE. Su relevancia radica en el potencial del miARN como biomarcador pronóstico emergente a implementar en el campo de la medicina cardiovascular en los hombres.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. WHO. 2006;
2. Lojanapiwat B, Weerusawin T, Kuanprasert S. Erectile dysfunction as a sentinel marker of endothelial dysfunction disease. *Singapore Med J.* 2009;50:698–701.
3. Planelles B, Margarit C, Ajo R, Sastre Y, Muriel J, Inda M del M, et al. Health benefits of an adverse events reporting system for chronic pain patients using long-term opioids. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2019;63:248–58.
4. Ajo R, Segura A, Mira L, Inda MDM, Alfayate R, Sánchez-Barbie A, et al. The relationship of salivary testosterone and male sexual dysfunction in opioid-associated androgen deficiency (OPIAD). *Aging Male.* 2017;20:1–8.
5. Recommendations of the 1st International Consultation on Erectile Dysfunction. In: Jardin A et al, eds. *Erectile Dysfunction.* Plymouth, UK: Health Publication, Ltd; 2000:711-726.
6. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and Its Medical and Psychosocial Correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol.* 1994;151:54–61.
7. Martin-Morales A, Sanchez-Cruz JJ, Saenz De Tejada I, Rodriguez-Vela L, Fernando Jimenez-Cruz J, Burgos-Rodriguez R. Prevalence and independent risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the epidemiologia de la disfuncion erectil masculina study. *J Urol.* 2001;166:569–75.
8. Rosen R, Khera M. *Epidemiology and etiologies of male sexual dysfunction.* UpToDate, Waltham, MA. 2021;
9. Aytaç, Mckinlay, Krane. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int.* 1999;84:50–6.
10. Puigvert-Martínez A, Prieto-Castro R. El diagnóstico y el tratamiento de disfunción eréctil en España: la opinión del médico de atención primaria. Proyecto «Atlas de la disfunción eréctil en España». *Rev Int Andrología.* 2015;13:92–8.

11. Sáenz de Tejada I, Angulo J, Cellek S, González-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, et al. Pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2005;2:26–39.
12. Martínez-Salamanca I, Martínez-Ballesteros C, Portillo L, Gabancho S, Moncada I, Carballido J. Fisiología De La Erección. *Arch Esp Urol.* 2010;6:581–8.
13. Lue TF. Erectile Dysfunction. Wood AJJ, editor. *N Engl J Med.* 2000;342:1802–13.
14. Madeira CR, Tonin FS, Fachi MM, Borba HH, Ferreira VL, Leonart LP, et al. Efficacy and safety of oral phosphodiesterase 5 inhibitors for erectile dysfunction: a network meta-analysis and multicriteria decision analysis. *World J Urol.* Springer Berlin Heidelberg; 2021;39:953–62.
15. SEMERGEN. Documento de Consenso sobre Disfunción Eréctil. *Med Fam.* 2003;255–63.
16. Vuong C, Van Uum SHM, O'Dell LE, Lutfy K, Friedman TC. The effects of opioids and opioid analogs on animal and human endocrine systems. *Endocr Rev.* 2010;31:98–132.
17. Furlan AD, Sandoval JA, Mailis-Gagnon A, Tunks E. Opioids for chronic noncancer pain: A meta-analysis of effectiveness and side effects. *C Can Med Assoc J.* 2006;174:1589–94.
18. Ajo R, Segura A, Inda M del M, Margarit C, Ballester P, Martínez E, et al. Disfunción eréctil en pacientes con dolor crónico tratados con opioides. *Med Clin (Barc).* 2017;149:49–54.
19. Mazo E, Gamidov S, Anranovich S, Iremashvili V, Billups KL. Testing endothelial function of brachial and cavernous arteries in patients with erectile dysfunction. Commentary. *J Sex Med.* 2006;3:323–30.
20. Mostafaei H, Mori K, Hajebrahimi S, Abufaraj M, Karakiewicz PI, Shariat SF. Association of erectile dysfunction and cardiovascular disease: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *BJU Int.* 2021;128:3–11.
21. Randrup E, Baum N, Feibus A. Erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Postgrad Med.* 2015;127:166–72.



22. Shin D, Pregoner G, Gardin JM. Erectile Dysfunction. *Cardiol Rev.* 2011;19:5–11.
23. 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;14:361–5.
24. Segura A, Romero J. Pacientes con riesgo cardiovascular. In: Luzan5, editor. *Guías actuación en Salud Sex.* 2011. p. 7–19.
25. Vlachopoulos C, Rokkas K, Ioakeimidis N, Aggeli C, Michaelides A, Roussakis G, et al. Prevalence of Asymptomatic Coronary Artery Disease in Men with Vasculogenic Erectile Dysfunction: A Prospective Angiographic Study. *Eur Urol.* 2005;48:996–1003.
26. Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Rotatori F, Veglia F, Briganti A, et al. Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: The COBRA trial. *Eur Heart J.* 2006;27:2632–9.
27. Jackson G, Rosen RC, Kloner RA, Kostis JB. The Second Princeton Consensus on Sexual Dysfunction and Cardiac Risk: New Guidelines for Sexual Medicine. *J Sex Med.* 2006;3:28–36.
28. Kloner RA. Erectile dysfunction as a predictor of cardiovascular disease. *Int J Impot Res.* 2008;20:460–5.
29. Debusk R, Drory Y, Goldstein I, Jackson G, Kaul S, Kimmel SE, et al. Management of sexual dysfunction in patients with cardiovascular disease: Recommendations of the Princeton consensus panel. *Am J Cardiol.* 2000;86:62–8.
30. Muller JE. Triggering Myocardial Infarction by Sexual Activity. *JAMA.* 1996;275:1405.
31. Plaza Pérez I. Current status of secondary prevention and cardiac rehabilitation programs in Spain. *Rev Esp Cardiol.* 2003;56:757–60.
32. Otero Chulian E, Fernández Olmo R, Mora Robles J, Lacal Peña JM, Delgado Pacheco J, Colman Llamozas R. Emphasizing the Cardiovascular Diseases: A State of the Art in Spain and Andalusia. *Trends Pharm Res Dev.* 2020;6:5–7.

33. Peiró Peiró AM. Utilización de la farmacogenética en la práctica clínica: tratamiento del dolor. *Med Clin (Barc)*. 2013;141:501–6.
34. Guidance D. Guidance for Industry: Pharmacogenomic Data Submissions. *Biotechnol Law Rep*. 2004;23:68–86.
35. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298 → Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999;100:1515–20.
36. 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;21:2655–63.
37. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCreddie RM, Wilcken DEL. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996;2:41–5.
38. Paice J, Penn R, Ryan V. Altered sexual function and decreased testosterone in patients receiving intraspinal opioids. *J Pain Symptom Manage*. 1994;9:126–31.
39. Katz N, Mazer NA. The Impact of Opioids on the Endocrine System. *Clin J Pain*. 2009;25:170–5.
40. Jovey RD, Ennis J, Gardner-Nix J, Goldman B, Hays H, Lynch M, et al. Use of Opioid Analgesics for the Treatment of Chronic Noncancer Pain - A Consensus Statement and Guidelines from the Canadian Pain Society, 2002. *Pain Res Manag*. 2003;8:3A-14A.
41. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, et al. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations. *Eur J Endocrinol*. 2008;159:507–14.
42. Eisenhardt A, Sperling H, Hauck E, Porst H, Stief C, Rübber H, et al. ACE gene I/D and NOS3 G894T polymorphisms and response to sildenafil in men with erectile dysfunction. *Urology*. 2003;62:152–7.
43. Muniz JJ, Lacchini R, Rinaldi TO, Nobre YTDA, Cologna AJ, Martins ACP, et

- al. Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. *Pharmacogenomics J.* 2013;13:189–96.
44. Dai F, Zhu L, Mi Y, Feng N. An Updated Meta-Analysis of the Effects of the Endothelial Nitric Oxide synthase Gene G894T Polymorphism and Erectile Dysfunction Risk. *Cell Biochem Biophys.* 2015;72:821–8.
45. Paskircioglu L, Atac FB, Erdem SR, Deveci S, Verdi H, Özkardeş 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;19:149–53.
46. Gallardo-Sánchez CA, Rivera-Cameras A, Morán-Moguel MC, Salazar-Páramo M, Dávalos-Rodríguez IP. Aplicaciones clínicas de miR-21: revisión de la literatura. *Rev Biomédica.* 2023;34:179–90.
47. Chen Y, Wang X. MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press; 2020;48:D127–31.
48. Cheng C, Wang Q, You W, Chen M, Xia J. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: A meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9.
49. de Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutiérrez E, Llorente-Cortés V. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev Esp Cardiol.* 2017;70:763–9.
50. Chen S, Sun X, Wu S, Jiang J, Zhu C, Xu K, et al. Role of identified noncoding RNA in erectile dysfunction. *Andrologia.* 2020;52:1–8.
51. Song J, Wang J, Liu K, Xu W, Sun T, Liu J. The role of microRNAs in erectile dysfunction: From pathogenesis to therapeutic potential. *Front Endocrinol.* 2022;13:1–14.
52. Park NC, Kim TN, Park HJ. Treatment Strategy for Non-Responders to PDE5 Inhibitors. *World J Mens Health.* 2013;31:31.
53. 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;49:822–30.

54. Woodward JMB, Hass SL, Woodward PJ. Reliability and validity of the sexual life quality questionnaire (SLQQ). *Qual Life Res.* 2002;11:365–77.
55. Zigmond AS, Snaith RP. The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr Scand.* 1983;67:361–70.
56. Terol M, López-Roig S, Rodríguez-Marín J, Martí-Aragón M, Pastor M, Reig M. Propiedades psicométricas de la Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HAD) en población española.. *Ansiedad y estrés.* 2007;1.
57. Lobo A, Chamorro L, Luque A, Dal-Ré R, Badia X, Baró E. Validación de las versiones en español de la Montgomery-Asberg Depression Rating Scale y la Hamilton Anxiety Rating Scale para la evaluación de la depresión y de la ansiedad. *Med Clin (Barc).* 2002;118:493–9.
58. Rasmussen S, Balasubramaniam K, Jarbøl DE, Søndergaard J, Haastrup PF. Socioeconomic status and barriers for contacting the general practitioner when bothered by erectile dysfunction: A population-based cross-sectional study. *BMC Fam Pract. BMC Family Practice;* 2020;21:1–9.
59. Lee Y, Huang S, Liu C, Yang Y, Yeh H, Li W, et al. The Association of eNOS G894T Polymorphism with Metabolic Syndrome and Erectile Dysfunction. *J Sex Med.* 2012;9:837–43.
60. Gao S, Chen J, Brodsky S V., Huang H, Adler S, Lee JH, et al. Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: A pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria. *J Biol Chem.* 2004;279:15968–74.
61. Yao HX, Ma FZ, Tan YY, Liu LY. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of erectile dysfunction: An updated meta-analysis of genetic association studies. *Int J Surg.* 2018;54:141–8.
62. Liu C, Lu K, Tao T, Zhang L, Zhang X, Jiang L, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Erectile Dysfunction: A Meta-Analysis. *J Sex Med.* 2015;12:1319–28.
63. Ben Khedher MR, Abid M, Jamoussi K, Hammami M. Comprehensive insight into functional interaction between GNB3 C825T and eNOS T-786C, G894T gene

polymorphisms and association with susceptibility to diabetic erectile dysfunction. *Andrology*. 2018;6:865–73.

64. Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, et al. New therapeutic implications of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function/dysfunction in cardiovascular disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2019.

65. Díaz Carrasco I, Guisado Rasco A, Ordoñez Fernández A. ¿Qué son los micro-RNA? ¿Para qué sirven? ¿Qué potenciales beneficios podrían tener en el contexto asistencial? *Cardiocre*. 2016;51:161–6.

66. Hofer IE, Steffens S, Ala-Korpela M, Bäck M, Badimon L, Bochaton-Piallat M-L, et al. Novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2015;36:2635–42.





## **10. ANEXOS**

### **ANEXO I. Artículos Tesis Doctoral Publicados**







## FE DE ERRATAS

**Artículo 1.** Segura A, Ballester P, Ajo R, Inda MD, Urbano A, Muriel J, Ochando I, Margarit C, Martinez E, Peiró AM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and erectile dysfunction in chronic pain. *Gene*. 2019;721S:100005. doi: 10.1016/j.gene.2019.100005. PMID: 34530994.

1. La leyenda de la Figura 1 debería corregirse: en lugar de “Fig. 1. IIEF-EF values for eNOS polymorphisms genotypes” debería poner “Fig. 1. Intron 4VNTR eNOS polymorphism separated by electrophoresis”.

2. En la página 3, en el apartado 3.1. Study population se alude a “(See Fig. 1.)” que no se corresponde con la Fig. 1 actual. Debería eliminarse esa referencia en el texto.

3. En el texto que se refiere a la Tabla 2 se cita: “Andrological treatment of the patients included in the study is presented in Table 2. Patients were treated with only with iPDE5 (28%), testosterone (43%) or both (28%)”. Debería poner “Patients were treated with only with iPDE5 (28%), testosterone (72%) or both (28%)”

**Artículo 2.** Ors D, Segura A, Arrarte V, Ballester P, Muriel J, Fernández G, Soriano J, Peiró AM. Erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease and the potential influence of genetic markers. *Rev Int Androl*. 2021 Oct-Dec;19(4):217-223. Spanish. doi: 10.1016/j.androl.2020.03.001. PMID: 32753341.

1. Error de transcripción en el resumen / abstract y en resultados, se menciona el polimorfismo G864T y en la Tabla 3 984T, en lugar de G894T que es el correcto.

2. En resultados, se menciona que la respuesta al tratamiento fue mejor en los genotipos nativos (wild type) para 786-TT y los mutados para el 894-GG (en el texto aparece como 894-TT) tal y como aparece en la Tabla 3.





## Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and erectile dysfunction in chronic pain <sup>☆</sup>

Ana Segura <sup>a,b</sup>, Pura Ballester <sup>b</sup>, Raquel Ajo <sup>b</sup>, María-del-Mar Inda <sup>b</sup>, Antonio Urbano <sup>c,d</sup>, Javier Muriel <sup>b,f</sup>, Isabel Ochando <sup>c,d</sup>, César Margarit <sup>b,e</sup>, Emi Martínez <sup>e</sup>, Peiro Ana M. Peiró <sup>b,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Andrology Unit, University General Hospital of Alicante (HGUA), Alicante, Spain

<sup>b</sup> Neuropharmacology on Pain Research Unit, Institute of Health and Biomedical Research of Alicante (ISABIAL-FISABIO), Alicante, Spain

<sup>c</sup> Genetics Unit, Clínica Vistahermosa HLA-Hospital, Alicante, Spain

<sup>d</sup> Histology and Anatomy Department, Miguel Hernández University (UMH), Alicante, Spain

<sup>e</sup> Pain Unit, HGUA, Alicante, Spain

<sup>f</sup> Occupational Observatory, University Miguel Hernández of Elche (UMH), Alicante, Spain

<sup>g</sup> Clinical Pharmacology, HGUA, Alicante, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

eNOS gene  
Pharmacogenetics  
Chronic pain  
T786C  
Erectile dysfunction  
iPDE5

### ABSTRACT

**Objectives:** To investigate whether *endothelial nitric oxide synthase (eNOS)* T786C, 4VNTR and G894 T gene polymorphisms could mediate in andrological treatment response in Spaniards.

**Subject patients/methods:** The study participants were Spaniard males with erectile dysfunction (ED) and chronic pain ( $n = 105$ ) recruited at the Pain Unit. *eNOS* polymorphisms were genotyped by quantitative polymerase chain reaction using Taqman specific probes. Statistical analyses were carried out using R-3.2.4 software.

**Results:** A total of 69 patients required andrological treatment and 76% of them improved ED upon iPDE5 (20%), testosterone (35%) or iPDE5/testosterone treatment (45%); being significantly better in T786C-CC patients. Multivariate regression analysis indicated that age, opioid daily dose and carriage of T786C-allele influenced the risk and ED severity in Spaniard chronic pain patients.

**Conclusion:** T786C polymorphism at *eNOS* locus appeared to be a major contributor in the variable erectile function iPDE5/testosterone response in Spaniards.

### 1. Introduction

Erectile function (EF) is regulated by relaxation and contraction of smooth muscle of penis that is mediated by nitric oxide (NO), the main vasoactive molecule mediator by induction of the production of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and promotion of the relaxation of corpus cavernosum (Burnett, 2006; Thameem et al., 2008). Evidences show that functional polymorphisms within endothelial NO synthase (*eNOS*) gene interfere with normal EF (Thameem et al., 2008), down-regulating NO production, lowering cGMP levels (Wang and Wang, 2000; Yang et al., 2014) and leading to an increased

erectile dysfunction (ED) predisposition (Erol et al., 2009; Jira et al., 2011).

Sexual problems are usually unrecognized and untreated in chronic illnesses like pain where other factors, as opioid induced androgen deficiency (Daniell, 2008; Ajo et al., 2017) and comorbidities, could worsen ED (Paice, 2003; Abs et al., 2000). In fact, approximately one half to two thirds of chronic non-cancer pain (CNP) patients reported reduced frequency in their sexual relationships (Buss and Leppert, 2014) and decreased desire/libido (Paice, 2003; Ambler et al., 2001); however, few of them received adequate treatment for these problems.

**Abbreviations:** eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ED, erectile dysfunction; EF, Erectle function; NO, nitric oxide; cGMP, 3',5'-cyclic guanosine monophosphate; CNP, chronic non-cancer pain; iPDE5, phosphodiesterase type 5 inhibitors; BMI, body mass index; VAS, Visual analogue scale; IIEF, International Index of Erectile Function; mSLQQ-QOL, modified Sexual Life Quality Questionnaire.

<sup>\*</sup> This article was originally published in Gene: X. Gene: X is now discontinued and the article is republished here for the reader's convenience. For citation purposes, please use the publication details of this article: Gene, 721S.

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Neuropharmacology on Pain Research Unit, Institute of Health and Biomedical Research of Alicante (ISABIAL-FISABIO), Alicante, Spain.

E-mail address: [peiro\\_ana@gva.es](mailto:peiro_ana@gva.es) (A.M. Peiró).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.100005>

Received 19 July 2018; Revised 29 November 2018; Accepted 17 December 2018

Available online 2 February 2019

0378-1119/© 2019 Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Knowledge gaps persist regarding ED prevalence and the influence of pharmacogenetics in andrological drug response (Chou et al., 2009). Genetic variants of *eNOS* gene (T786C, intron 4VNTR and G894T) have been widely studied and related to several vascular diseases. The *eNOS* G894T polymorphism in exon 7 was reported to cause an amino acid substitution (Glu to Asp at codon 298, Glu298Asp) resulting in disturbance of its activity and NO production (Lee et al., 2012), as well as T786C polymorphism that is located in the promoter region of the gene (Nakayama et al., 1999). *eNOS* intron 4 tandem repeats (4VNTR) polymorphism consists in a 27-bp variable number of tandem repeats that influences protein synthesis and enzymatic activity (Sinici et al., 2010). All of these *eNOS* gene variants have been associated as independent risk factors in the pathogenesis of ED (Lee et al., 2012; Sinici et al., 2010; Erkan et al., 2006). However, these genetic association studies have been mostly conducted in other ethnic background populations (Casas et al., 2006) and to date, genetic studies examining these polymorphisms in chronic pain patients with ED in Spaniards are limited.

The present study aimed to explore a scarcely studied aspect of chronic pain: sexuality on patients chronically treated with opioids and whether *eNOS* polymorphisms, could be associated to a different EF response to andrological treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

CNP patients receiving oral and/or transdermal opioid treatment for at least one year that spontaneously notified sexual dysfunction in their routine clinical controls were eligible for participation and derived to the Andrology Unit for diagnosis and treatment. All participants were informed about the study design and purpose by their clinician and gave written consent. Hospital Ethics Committee approved the study.

Prescreening was done in a total of 125 unrelated males of Spaniard origin, outpatients of the Pain Unit of Alicante Department of Health-General Hospital and 84 patients confirmed ED, from which 15 were excluded due to several reasons (did not meet inclusion criteria, were not suitable for andrological treatment, were lost in follow-up or other clinical base pathology as cancer). Thus finally, 69 patients were included according to the inclusion criteria. Patient's age ranged from 18 to 80 years old, all were free of alcohol or drug dependencies and none of them were taking hormone medication (supplementation or deprivation) or phosphodiesterase type 5 inhibitors (iPDE5) before the study. Patients who experienced any sexual dysfunction prior to the onset of chronic pain were excluded.

### 2.2. Outcomes

All patients received a thorough medical examination, including medical and drug history at baseline and upon 6 months of andrological treatment (final visit).

Demographic information was collected (patients' age, body mass index (BMI), marital status, ethnic background) at first visit. Validated scales and questionnaires completed at each visit were used to evaluate the clinical situation for each patient. Pain intensity and relief were measured using the Visual Analogue Scale (VAS) (McCormack et al., 1988). Both consist of a 100 mm horizontal line ranging from 0 (lowest) to 100 mm (highest), where the patient points on the line the intensity or relief of pain that feels, respectively. Quality of life of the patients was evaluated through the VAS-EuroQol Scale that consists in a vertical line from 0 (the worst imaginable health status) to 100 mm (the best imaginable) where the patient pointed his actual health status (EuroQol, 1990).

The International Index of Erectile Function (IIEF) questionnaire was used to assess male sexual functioning, particularly the presence or absence of ED. The IIEF questionnaire consists of 15 items grouped into 5 sexual function domains: EF, orgasmic function, sexual desire, satisfaction with sexual intercourse and overall satisfaction. Higher scores in this questionnaire correspond to lower degrees of dysfunction. The domain assessing EF (IIEF-EF) includes 6 questions (maximum score of 30) and is a reliable measure for classifying the degree of ED as severe (1–10), moderate (11–16), mild (17–25) and normal/no dysfunction ( $\geq 26$ ) (Rosen et al., 2002).

In addition, patients were asked to fulfill a questionnaire on sexual quality of life, the modified Sexual Life Quality Questionnaire (mSLQQ-QOL). This is a multidimensional tool on which patients and their partners were asked to compare their experiences prior to the onset of the ED with their experiences since treatment began. It presents 10 assessment items: frequency of sex; duration of sex; ease of insertion; ease of achieving orgasm; ease of initiating sex; pleasure of anticipation; carefree feelings during sex; pleasure of orgasm; pleasure overall; and partner pleasure (Fisher et al., 2005).

Furthermore, patients were encouraged to report their drug prescriptions and any noxious, unintended, or undesired effect associated to analgesic prescription using a self-completed questionnaire (World Health Organization, 1969). In order to translate the dose and route of each of the opioids that the patient received daily morphine equivalent daily dose (MEDD) was calculated using available references (Pergolizzi et al., 2008).

### 2.3. Andrological diagnosis and treatment

American and European Urological Associations Guidelines recommend an initial evaluation that includes sexual, medical, and psychosocial histories as well as laboratory tests thorough to identify comorbid conditions as cardiovascular disease (including hypertension, atherosclerosis, or hyperlipidemia), diabetes mellitus, depression, or alcoholism that may predispose patients to ED and that may contraindicate certain therapies (Hatzimouratidis et al., 2010; Montague et al., 2005). This assessment was performed at baseline visit at the Andrological Unit and after 6 months of follow-up at final visit as regular clinical controls.

Additional risk factors included smoking, pelvic, perineal, or penile trauma or surgery, neurologic disease, endocrinopathy, obesity, pelvic radiation therapy, Peyronie's disease, and prescription or recreational drug use. Finally, a history of the partner's sexual function was obtained. A focused physical examination evaluating the abdomen, penis, testicles, secondary sexual characteristics and lower extremity pulses was performed. Additional testing, as testosterone level measurement, was performed in selected patients.

Guidelines also recommend offering iPDE5 as first-line therapy for ED unless the patient has contraindications to its use. Thus, prescriptions were performed as usual for ED management and included iPDE5 and/or testosterone replacement. There were three main oral drugs categories for the ED treatment: vardenafil, sildenafil and tadalafil. All of these drugs belong to the group of iPDE5 and have similar mechanisms of action that consist in increasing the blood flow into the penis to facilitate erection when the patient is sexually stimulated. Patients with diminished libido and ED might present low serum testosterone levels. Testosterone levels were measured in blood samples. If testosterone levels were low, prescription of transdermal testosterone or testosterone gel was performed. The increase of male sexual functioning was calculated as the difference of IIEF (or IIEF-EF) scores at final visit from baseline.

Risk-factor modification, including lifestyle interventions as exercise and weight loss, were recommended to patients with ED. Patients who had serious cardiac disease, exertional angina or were taking several antihypertensive drugs were encouraged to seek for the advice of a cardiologist before beginning iPDE5 therapy.

## 2.4. eNOS genotyping

Approximately 2 mL of saliva were collected in PBS containing tubes. Genomic DNA was isolated with E.N.Z.A. Forensic DNA Kit (Omega bio-tek) according to manufacturer's instructions. Genotyping of T786C (rs2070744) and G894T (rs1799983) eNOS polymorphisms were performed by real time polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific TaqMan probes MGB® (Applied Biosystems). All PCR amplifications were carried out in a RT-PCR Rotor Gene Q (Qiagen). The amplification parameters were as follows: 10 min initial denaturation at 95 °C, 40 cycles for 15 s at 92 °C, 90 s at 60 °C, and 1 min final extension at 60 °C. For the 27-bp intron 4VNTR eNOS polymorphism genotyping, conventional PCR was performed with 200 ng of DNA followed by gel electrophoresis. There are three different alleles for this polymorphism: allele "a" of 453 bp, "b" of 480 bp, and "c" of 507 bp. The amplification parameters were as follows: 15 min initial denaturation at 96 °C, 35 cycles for 30 s at 95 °C, 20 s at 59 °C, and 45 s at 72 °C, and 10 min final extension at 72 °C. Primers used for PCR amplification were: forward 5'-TGGAAAGGTAGGGGACTG-3' and reverse 5'-GGTCACAGGCGTCCAGTA-3'. PCR products were loaded in a 4% agarose gel and visualized under UV light.

## 2.5. Statistical analyses

Quantitative data is presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Shapiro Wilk test was used to test for normality. A *t*-test for independent samples or a Mann Whitney *U* test was used to assess group differences between two groups and ANOVA with Bonferroni's correction or Kruskal Wallis test was used for more than two groups. Relative frequencies of genotypes and alleles were calculated for each group. Subjects were grouped also as carriers and non-carriers, defined as participants who tested positive for the presence of the allelic variants (dominant model). The association between IIEF-EF and improvement of erectile functioning upon treatment and SNPs genotyped were examined using multiple logistic regressions adjusting for patients' age, body mass index, morphine equivalent daily dose, pain intensity, quality of sexual life and antidepressive use, at last dispensing. Analyses were carried out with R software package version 3.2.4 and *p* values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Study population

Demographic and clinical variables of the subject's pre- (baseline) and post-andrological treatment (final visit) are shown in [Table 1](#). (See [Fig. 1](#).)

All participants ( $n = 125$ ,  $57 \pm 12$  years, 100% Caucasian Spaniards) spontaneously reported decreased libido and/or ED, and were referred to the Andrology Unit where 84 (67%) patients confirmed the ED and 69 patients finished the. Thus, 15 (18%) patients were excluded due to several reasons (loss of follow-up, withdrawal of consent, ED associated to other pathologies, or they did not comply with the prescribed treatment).

Finally, 69 male CNP patients finished the study ( $58 \pm 11$  years-old, BMI  $30 \pm 5$  kg/m<sup>2</sup>). The majority were married (69%) followed by divorced (14%) and were retired (56%). The average duration of pain in chronic opioid therapy was 5.5 years (MEDD  $115 \pm 109$  mg/day), with a baseline intensity of pain moderate (VAS  $57 \pm 25$  mm) and moderate quality of life (VAS-EuroQol  $52 \pm 22$  mm). Most of them received adjuvant drugs, mainly anticonvulsants and near 40% antidepressants. Comparison of demographic characteristics confirmed that the current sample was representative of patients who are typically seen at the Pain Unit of the Alicante General Hospital (data not shown).

**Table 1**  
Demographic, clinical and biochemical variables.

	Baseline	Final visit	<i>p</i> -Value
Age (years)	57.9 $\pm$ 11.0	–	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.4 $\pm$ 5.1	–	
Heart rate (bpm)	70.8 $\pm$ 12.4	68.6 $\pm$ 12.9	0.710
Systolic blood pressure (mm Hg)	133 $\pm$ 15.6	138 $\pm$ 15.3	0.455
Diastolic blood pressure (mm Hg)	76.8 $\pm$ 9.7	77.3 $\pm$ 14.8	0.901
Total testosterone (range 3–10 ng/mL)	3.2 $\pm$ 1.5	4.5 $\pm$ 3.4	<b>0.011</b>
Free testosterone (range 5.5–70.8 ng/mL)	26.7 $\pm$ 12.9	32.4 $\pm$ 23.8	0.168
Creatinine (mg/dL)	0.92 $\pm$ 0.25	1.30 $\pm$ 1.76	0.983
Total cholesterol (mg/dL)	179.8 $\pm$ 40.8	165.7 $\pm$ 70.5	0.952
LDL cholesterol (mg/dL)	110.5 $\pm$ 33.2	116.8 $\pm$ 32	0.497
HDL cholesterol (mg/dL)	46.3 $\pm$ 13.3	45.6 $\pm$ 15.2	0.989
Triglycerides (mg/dL)	145.5 $\pm$ 93.1	183.8 $\pm$ 158.6	0.629
MEDD (mg/day)	115 $\pm$ 109		
IIEF (5–75 scores)	26 $\pm$ 14.7	45.9 $\pm$ 20.1	<b>&lt; 0.001</b>
IIEF-EF (1–30 scores)	8.6 $\pm$ 6.9	18.6 $\pm$ 9.8	<b>&lt; 0.001</b>
mSLQQ-QOL (0–100 scores)	19.8 $\pm$ 16.2	54.3 $\pm$ 26.1	<b>&lt; 0.001</b>

BMI: body mass index; MEDD: Morphine equivalent daily dose; IIEF: International Index of Erectile Function; IIEF-EF: IIEF erectile function domain; mSLQQ-QOL: modified Sexual Life Quality Questionnaire. Values are mean  $\pm$  SD; Significant differences ( $p < 0.05$ ) are written in bold.

### 3.2. Andrology unit treatment

Most of the patients presented at baseline visit a severe ED (73% IIEF-EF  $\leq 10$  scores; IIEF  $26 \pm 14.7$  scores; IIEF-EF subdomain  $8.6 \pm 6.9$  scores) and poor male sexual quality of life (mSLQQ-QOL  $19.8 \pm 16.2$  scores). Multiple regression analysis showed that EF at baseline was positively influenced by a better sexual quality of life and negatively by age and BMI ( $p < 0.05$ , F-statistic = 9.94;  $r^2 = 0.453$ ). Also, anxiolytic use, but not antidepressive, negatively influence EF severity ( $p = 0.003$ ). At final visit, none of the variables analyzed (age, BMI, MEDD, sexual quality of life, drugs prescribed or genotype) significantly influenced ED response to the andrological treatment.

Andrological treatment of the patients included in the study is presented in [Table 2](#). Patients were treated with iPDE5 (28%), testosterone (43%) or both (28%) with a significant improvement at the end of the study of male sexual functioning (IIEF  $45.9 \pm 20.1$  scores), EF (IIEF-EF subdomain  $18.6 \pm 9.8$  scores,  $p = 0.000$ ) and sexual quality of life (mSLQQ-QOL  $54.3 \pm 26.1$  scores,  $p = 0.000$ ) ([Table 1](#)).

### 3.3. eNOS genotyping

Genotypes and allele frequencies for eNOS polymorphisms studied and their influence on IIEF-EF and mSLQQ-QOL scores, are presented in [Tables 3, 4 and 5](#).

Genotypes and alleles frequencies for T786C and G894 T polymorphisms were in agreement with the Hardy-Weinberg Equilibrium ( $p \geq 0.05$ ). In our study, frequency of T786C-C allele of all patients genotyped was 57.1% and of G894 T-G allele 61.5% both similar to Caucasian prevalence. Variant "c" of intron 4VNTR polymorphism was not found in our sample. Allele "a" of intron 4VNTR "was present in only 2.2% in our study (Supplementary Fig. 1).

Upon 6 months of andrological treatment, IIEF-EF values tended to improve in all the patients independently of eNOS genotype. However, when analyzing by allele presence, patients homozygous for C allele of T786C exhibited the most significant improvement in EF response to andrological treatment.

All the patients except one were b/b for intron 4 VNTR polymorphism; thus the influence of 4VNTR genotype could not be analyzed.

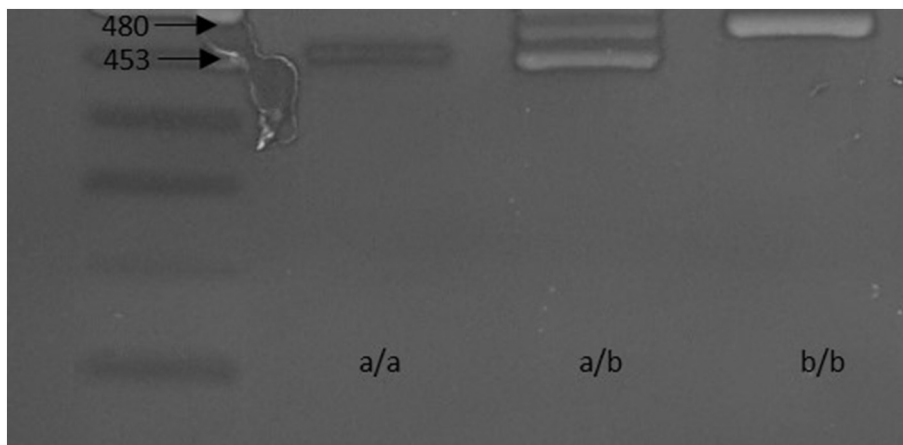


Fig. 1. IIEF-EF values for eNOS polymorphisms genotypes.

**Table 2**  
Andrological treatment of patients included in the study.

	iPED5	Testosterone
Testosterone	28%	72%
iPED5	56%	28%
Vardenafil	25%	13%
Tadalafil	16%	9%
Sildenafil	16%	6%
Total	56%	72%

Sexual quality of life was significantly improved in all the patients independently of their genotype. No differences were found also when the analysis was performed by allele (Table 5).

### 3.4. Interaction between clinical and eNOS gene polymorphisms

We further analyzed the interaction of these polymorphisms in relation to EF response (Table 4). Multiple regression analysis indicated that baseline EF was positively influenced by the carriage of T786C-C allele ( $p = 0.029$ ); and negatively by age ( $p = 0.015$ ) and MEDD ( $p = 0.006$ ) (F-statistic = 5.259;  $r^2 = 0.283$ ). Antidepressants prescription did not influence EF risk or response to andrological treatment, in this population.

## 4. Discussion

In the present study, EF and sexual quality of life improved significantly after 6 months of andrological treatment in Spaniards CNP patients, even more in patients carrying T786C-CC genotype. To the best of our knowledge, this is the first association study of eNOS poly-

**Table 3**  
Frequencies of combined genotypes polymorphisms.

Polymorphism	Genotype (n = 49)			Allele 1 frequency		p Value
	1/1	1/2	2/2	Study	Population	
	T786C (rs2070744)	30.6% (CC)	53.1% (CT)	16.3% (TT)	57.1% (C)	
G894T (rs1799983)	35.4% (GG)	52.1% (GT)	122.5% (TT)	61.5% (G)	50–65%	ns
Intron 4VNTR	2.2% (a/a)	0% (a/b)	98.8% (b/b)	97.8% (b)	1–3%	ns

1: wild type allele; 2: mutant allele. Comparison between allele frequency in our study and data from 1000 genomes was performed by U-Man Whitney test. Intron 4VNTR has been obtained from references (Wang and Wang, 2000; Gao et al., 2017; Yang et al., 2017).

**Table 4**  
Comparison of IIEF scores according to eNOS polymorphisms genotypes.

	IIEF-EF Baseline	IIEF-EF Final visit	EF Improvement (%)	#p- Value
T786C				
- TT	4.3 ± 4.5	13.5 ± 8.3	83	<b>0.024</b>
- TC	9.5 ± 7.2	15.3 ± 11.1	64	0.167
- CC	7.1 ± 5.1	23.9 ± 7	85	<0.001
*p Value	0.168	0.079		
G894 T				
- GG	8.8 ± 6.7	21.0 ± 9.8	82	<b>0.004</b>
- GT	7.5 ± 6.5	17.3 ± 10.7	64	<b>0.006</b>
- TT	7.3 ± 6.3	21.4 ± 6.0	100	<b>0.014</b>
*p Value	0.673	0.636		
Intron 4 VNTR				
- a/a	3	27	100	nd
- b/b	7.8 ± 6.5	20.5 ± 9.1	80	<0.001
*p Value	nd	nd		

Data appears as mean ± SD. \* p value: comparison between genotypes at baseline or final visit; #p value: comparison between baseline and final visit. Bold when  $p < 0.05$ .

morphisms and EF in a population with CNP free of alcohol or drug dependencies.

NO has a crucial role in the vascular homeostasis, regulation of blood flow and blood pressure. Penile tumescence begins with the release of NO from either nonadrenergic noncholinergic nerve terminals or endothelial cells, and inadequate NO production during sexual stimulation can result from downregulation of NOS expression (Tsukada et al., 1998; Safarinejad et al., 2011). Several allelic variants

**Table 5**  
Comparison of mSLQ-QOL scores according to eNOS polymorphisms genotypes.

	mSLQ-QOL Baseline	mSLQ-QOL Final visit	mSLQ-QOL Improvement	#p-Value
<b>T786C</b>				
- TT	22.3 ± 15.4	71.9 ± 11.8	52.5 ± 12.9	< 0.001
- TC	16.5 ± 17.1	47 ± 31.4	36.4 ± 32.4	< 0.001
- CC	20.1 ± 17.6	52.3 ± 23.9	35 ± 23.7	0.003
*p Value	0.577	0.377	0.506	
<b>G894 T</b>				
- GG	19.1 ± 17.1	41.8 ± 26.6	30.5 ± 31.2	0.028
- GT	19.8 ± 17.1	57.4 ± 25.4	40.7 ± 25.1	< 0.001
- TT	14.5 ± 14.4	56.6 ± 38.3	46.6 ± 33	0.056
*p Value	0.819	0.482	0.624	
<b>Intron 4 VNTR</b>				
- a/a	26.3	nd	nd	nd
- b/b	19.7 ± 17.1	51.7 ± 28.7	36 ± 27.8	< 0.001
*p Value	nd	nd	nd	

Data appears as mean ± SD. \*p value: comparison between genotypes at baseline or final visit; #p value: comparison between baseline and final visit. Bold when  $p < 0.05$ .

of the eNOS gene can affect their expression levels. Most studied polymorphism is G894 T that leads to a decreased enzyme activity, decreased basal NO production and a 20% of lower activity (Lee et al., 2012). In a recent meta-analysis this low eNOS mRNA and serum NO levels, were observed in G894 T-GG genotype (Gao et al., 2017) with an increased risk for earlier onset of ED (OR = 3.572;  $p < 0.020$ ). Further subgroup analysis based on ethnicity suggested that G894 T was significantly associated with risk of ED in Asians ( $p = 0.003$ ), but not in Caucasians ( $p = 0.166$ ) (Paradossi et al., 2004; Naber et al., 2001; Yang et al., 2017). In our study, no differences were observed for G894 T polymorphism, neither at baseline or final EF nor in response to andrological treatment.

In the same line, T786C polymorphism is tightly associated with an increased risk of ED. A reduced eNOS expression, eNOS mRNA and serum NO levels together with a decreased NO-induced vasomotor function were observed in individuals carrying the T786C-CC genotype (Gao et al., 2017). However, in our study this poor basal EF was the most improved after andrological therapy. In a population case-control study that enrolled 112 patients with ED and 156 age-matched healthy men, the risk genotype of T786C exhibited lower male sexual functioning than patients with the non-risk genotype ( $8.2 \pm 4.5$  vs  $12.2 \pm 5.0$  IIEF-EF scores;  $p < 0.015$ ). In agreement with this data, our study showed that Spaniard patients with T786C-CC genotype presented one of the worst basal male sexual functioning, although achieved the best ED response.

The influence of 4VNTR polymorphism could not be studied in our sample due to the low frequency of a/a genotype. Genotypic frequencies for this polymorphism are not well established and further studies in larger cohorts and in different ethnic backgrounds should be performed. In relation to the frequency of the eNOS gene intron 4VNTR polymorphism and its' influence on EF continue being controversial with scarce data supporting this (Erol et al., 2009; Liu et al., 2015; Wang et al., 2010; Yang et al., 2015). In a meta-analysis performed to estimate the association between eNOS polymorphisms and ED risk, the overall analysis showed a significant association to b/b variant (OR = 1.917, CI: 1.073–3.424) (Liu et al., 2015). However, these results are still preliminary and our study did not achieve enough power to analyze 4VNTR polymorphism influence in ED prevalence or response. Future studies with larger populations would be necessary.

It has been determined that eNOS polymorphisms are clinically relevant for other diseases. Decreased NO synthesis, eNOS gene polymorphisms, and/or arginine deficiency may cause increased levels of circulating NOS inhibitors, that contribute to vascular changes (as

increase in arterial pressure or intraglomerular hypertension or progression of atherosclerosis) (Nehra, 2009) in different illnesses (Kojda and Harrison, 1999; Skovgaard et al., 2005) like chronic kidney disease (Hsu et al., 2012), osteoporosis (Gu et al., 2015) or coronary artery disease (Sung et al., 2015). Thus, ED might be a sign of cardiovascular or systemic problems as a sentinel symptom.

Our study presents some limitations that should be considered. First, the number of patients included in the study is very low, especially when polymorphisms with low frequency such as intron 4VNTR are studied. Second, sexuality is a complex process influenced by many factors (geographical location, lifestyle, dietary habits, personal and partner, for example) and may be influenced by many other circumstances. In our study, EF was influenced positively by better sexual quality of life; and coherently negatively by age, BMI, opioid daily dose and anxiolytic therapy. This points out the relevance to review patient's life-style and drug prescriptions, to improve ED as a first step intervention. Third, sexual dysfunction appears to be more commonly associated to chronic illnesses where other symptoms including fatigue, depression, muscular weakness and opioid drugs may affect sexual function apart of genotype (Schnatz et al., 2010; Uguz et al., 2011). Fourth, variants at eNOS locus may relate to the ethnic-specific predisposition (Tanus-Santos et al., 2001; Guo et al., 2005). Fifth, no control group was included (i.e. patients with chronic pain and opioid treatment without erectile dysfunction) that will allow to establish more robust conclusions. In addition, further studies using a large population size should be conducted. In addition, it would be interesting to analyze if response to andrological treatment was dosage dependent, however, in our study, most of the patients were receiving similar testosterone or iPED5 doses and no analysis could be made.

Our results support that T786C polymorphism of eNOS gene is associated with a different ED response in CNP Spaniards males that should be interpreted taking into consideration the genetic backgrounds, the multifactorial nature of ED and the fact that the results need to be replicated in other ethnic populations.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.100005>.

## Acknowledgments

We thank all study participants and members of the Neuropharmacology on Pain (NED) group, for their participation and cooperation. This study was supported by grants from the Spanish Pain Foundation (FED, Madrid, Spain) (PI-2015-FED03, 2015) and from ISABIAL-FISABIO (UGP-14-324, 2016).

## Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

## References

- Abs, R., Verhelst, J., Maeyaert, J., et al, 2000. Endocrine consequences of long-term intrathecal administration of opioids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2215–2222.
- Ajo, R., Segura, A., Mira, L., et al, 2017. The relationship of salivary testosterone and male sexual dysfunction in opioid-associated androgen deficiency (OPIAD). *Aging Male* 20, 1–8.
- Ambler, N., Williams, A.C., Hill, P., Gunary, R., Cratchley, G., 2001. Sexual difficulties of chronic pain patients. *Clin. J. Pain* 17, 138–145.
- Burnett, A.L., 2006. The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* 8, 53–62.
- Buss, T., Leppert, W., 2014. Opioid-induced endocrinopathy in cancer patients: an underestimated clinical problem. *Adv. Ther.* 31, 153–167.
- Casas, J.P., Cavalleri, G.L., Bautista, L.E., Smeeth, L., Humphries, S.E., Hingorani, A.D., 2006. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 164, 921–935.
- Chou, R., Ballantyne, J.C., Fanciullo, G.J., Fine, P.G., Miaskowski, C., 2009. Research gaps on use of opioids for chronic noncancer pain: findings from a review of the evidence for an American pain society and American Academy of pain medicine clinical practice guideline. *J. Pain* 10, 147–159.

- Daniell, H.W., 2008. Opioid endocrinopathy in women consuming prescribed sustained-action opioids for control of nonmalignant pain. *J. Pain* 9, 28–36.
- Erkan, E., Muslumanoglu, A.Y., Oktar, T., Sanli, O., Ozbek, U., Kadioglu, A., 2006. Polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in patients with erectile dysfunction. *J. Sex. Med.* 3, 69–75.
- Erol, B., Bozdogan, G., Akduman, B., et al, 2009. eNOS gene intron 4 VNTR and exon 7-G894T polymorphisms in Turkish men with erectile dysfunction: a case control study. *J. Sex. Med.* 6, 1423–1429.
- EuroQol, G., 1990. EuroQol—a new facility for the measurement of health-related quality of life. *Health Policy* 16, 199.
- Fisher, W.A., Rosen, R.C., Mollen, M., et al, 2005. Improving the sexual quality of life of couples affected by erectile dysfunction: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of vardenafil. *J. Sex. Med.* 2, 699–708.
- Gao, L., Zhao, Z., Guo, F., et al, 2017. Association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms with an increased risk of erectile dysfunction. *Asian J. Androl.* 19, 330–337.
- Gu, Z., Zhang, Y., Qiu, G., 2015. Promoter polymorphism T-786C, 894G → T at exon 7 of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with risk of osteoporosis in Sichuan region male residents. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 15270–15274.
- Guo, X., Cheng, S., Taylor, K.D., et al, 2005. Hypertension genes are genetic markers for insulin sensitivity and resistance. *Hypertension* 45, 799–803.
- Hatzimouratidis, K., Amar, E., Eardley, I., et al, 2010. Guidelines on male sexual dysfunction: erectile dysfunction and premature ejaculation. *Eur. Urol.* 57, 804–814.
- Hsu, C.N., Huang, L.T., Lau, Y.T., Lin, C.Y., Tain, Y.L., 2012. The combined ratios of L-arginine and asymmetric and symmetric dimethylarginine as biomarkers in spontaneously hypertensive rats. *Transl. Res.* 159, 90–98.
- Jira, M., Zavodna, E., Honzikova, N., et al, 2011. Association of eNOS gene polymorphisms T-786C and G894T with blood pressure variability in man. *Physiol. Res.* 60, 193–197.
- Kojda, G., Harrison, D., 1999. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 43, 562–571.
- Lee, Y.C., Huang, S.P., Liu, C.C., et al, 2012. The association of eNOS G894T polymorphism with metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J. Sex. Med.* 9, 837–843.
- Liu, C., Lu, K., Tao, T., et al, 2015. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and erectile dysfunction: a meta-analysis. *J. Sex. Med.* 12, 1319–1328.
- McCormack, H.M., Horne, D.J., Sheather, S., 1988. Clinical applications of visual analogue scales: a critical review. *Psychol. Med.* 18, 1007–1019.
- Montague, D.K., Jarow, J.P., Broderick, G.A., et al, 2005. The management of erectile dysfunction: an AUA update. *J. Urol.* 174, 230–239.
- Naber, C.K., Baumgart, D., Altmann, C., Siffert, W., Erbel, R., Heusch, G., 2001. eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H1908–H1912.
- Nakayama, M., Yasue, H., Yoshimura, M., et al, 1999. T-786 → C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99, 2864–2870.
- Nehra, A., 2009. Erectile dysfunction and cardiovascular disease: efficacy and safety of phosphodiesterase type 5 inhibitors in men with both conditions. *Mayo Clin. Proc.* 84, 139–148.
- Paice, J., 2003. Sexuality and chronic pain. *Am. J. Nurs.* 103, 87–89.
- Paradossi, U., Ciofini, E., Clerico, A., Botto, N., Biagini, A., Colombo, M.G., 2004. Endothelial function and carotid intima-media thickness in young healthy subjects among endothelial nitric oxide synthase Glu298 → Asp and T-786 → C polymorphisms. *Stroke* 35, 1305–1309.
- Pergolizzi, J., Boger, R.H., Budd, K., et al, 2008. Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an international expert panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization step III opioids (buprenorphine, fentanyl, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone). *Pain Pract.* 8, 287–313.
- Rosen, R.C., Cappelleri, J.C., Gendrano 3rd, N., 2002. The International Index of Erectile Function (IIEF): a state-of-the-science review. *Int. J. Impot. Res.* 14, 226–244.
- Safarinejad, M.R., Khoshdel, A., Shekarchi, B., Taghva, A., Safarinejad, S., 2011. 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.* 107, 1994–2001.
- Schnatz, P.F., Whitehurst, S.K., O'Sullivan, D.M., 2010. Sexual dysfunction, depression, and anxiety among patients of an inner-city menopause clinic. *J. Women's Health (Larchmt)* 19, 1843–1849.
- Sinici, I., Guven, E.O., Serefoglu, E., Hayran, M., 2010. T-786C polymorphism in promoter of eNOS gene as genetic risk factor in patients with erectile dysfunction in Turkish population. *Urology* 75, 955–960.
- Skovgaard, N., Galli, G., Abe, A., Taylor, E.W., Wang, T., 2005. The role of nitric oxide in regulation of the cardiovascular system in reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 142, 205–214.
- Sung, J.H., Lee, B.E., Kim, J.O., et al, 2015. Association between eNOS polymorphisms and risk of coronary artery disease in a Korean population: a meta-analysis. *Genet. Mol. Res.* 14, 16508–16520.
- Tanus-Santos, J.E., Desai, M., Flockhart, D.A., 2001. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 11, 719–725.
- Thameem, F., Puppala, S., Arar, N.H., et al, 2008. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes-related traits in Mexican Americans. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 5, 109–113.
- Tsukada, T., Yokoyama, K., Arai, T., et al, 1998. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 190–193.
- Uguz, F., Sahingoz, M., Gezginc, K., Ayhan, M.G., 2011. Quality of life in postmenopausal women: the impact of depressive and anxiety disorders. *Int. J. Psychiatry Med.* 41, 281–292.
- Wang, X.L., Wang, J., 2000. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol. Genet. Metab.* 70, 241–251.
- Wang, J.L., Wang, H.G., Gao, H.Q., Zhai, G.X., Chang, P., Chen, Y.G., 2010. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and erectile dysfunction: a meta-analysis. *J. Sex. Med.* 7, 3889–3898.
- World Health Organization, 1969. International drug monitoring: the role of the hospital. In: Technical Report Series No. 425. Geneva, Switzerland, pp. 1–24.
- Yang, Y., Du, K., Liu, Z., Lu, X., 2014. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 4b/a gene polymorphisms and coronary artery disease: evidence from a meta-analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7987–8003.
- Yang, C., Qi, Z.Y., Shao, C., Xing, W.K., Wang, Z., 2015. Association between three eNOS polymorphisms and intracranial aneurysms risk: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 94, e452.
- Yang, B., Liu, L., Peng, Z., et al, 2017. Functional variations in the NOS3 gene are associated with erectile dysfunction susceptibility, age of onset and severity in a Han Chinese population. *J. Sex. Med.* 14, 551–557.



ORIGINAL

# Disfunción eréctil en pacientes con enfermedad cardiovascular y potencial influencia de marcadores genéticos



Diego Ors<sup>a</sup>, Ana Segura<sup>b</sup>, Vicente Arrarte<sup>c</sup>, Pura Ballester<sup>d</sup>, Javier Muriel<sup>d</sup>, Guillermina Fernández<sup>b</sup>, Josefa Soriano<sup>d</sup> y Ana M. Peiró<sup>d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Observatorio Ocupacional, Universidad Miguel Hernández (UMH), Elche, España

<sup>b</sup> Unidad de Andrología, Servicio de Urología, Hospital General Universitario de Alicante (HGUA), España

<sup>c</sup> Neurofarmacología del dolor (NED), Unidad de Investigación, Departamento de Salud de Alicante, Hospital General, ISABIAL, Alicante, España

<sup>d</sup> Servicio de Cardiología, Hospital General Universitario de Alicante (HGUA), España

<sup>e</sup> Unidad de Farmacología Clínica, Hospital General Universitario de Alicante (HGUA), España

Recibido el 25 de junio de 2019; aceptado el 13 de marzo de 2020

Disponible en Internet el 2 de agosto de 2020

## PALABRAS CLAVE

Disfunción eréctil;  
Enfermedad  
cardiovascular;  
Gen *eNOS*;  
iPDE5

## Resumen

**Introducción:** La asociación de la disfunción eréctil (DE) y la enfermedad cardiovascular (ECV) es bien conocida, siendo un factor temprano de riesgo independiente que puede aparecer hasta cinco años antes del inicio de los síntomas cardiovasculares. En su fisiopatología podría estar implicada la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) como vasodilatador endógeno. Nuestro objetivo fue analizar la influencia de variantes del gen *eNOS* en la respuesta al tratamiento de la DE, en pacientes con ECV.

**Metodología:** Estudio observacional, prospectivo, en pacientes con DE del Programa de Rehabilitación Cardíaca. Se recogieron variables demográficas (Índice Internacional de Función Eréctil [IIEF]), calidad de vida sexual (mSLQQ), ansiedad y depresión (HAD), junto con los factores de riesgo cardiovascular (FRCV). El análisis genético de los polimorfismos T-786C, G894T del gen *eNOS* se realizó mediante RT-PCR con sonda TaqMan. Los datos fueron analizados mediante SPSS 25.

**Resultados:** Los pacientes ( $n = 35$ ,  $60,8 \pm 8,44$  años) mostraron una mediana de una ECV (RIC 1-3) con una DE grave (IIEF-EF de  $9,4 \pm 6,73$  puntos) y una baja percepción de su calidad de vida sexual ( $-19,4 \pm 8,37$  puntos). En la visita final ( $n = 15$ ), hubo un 71% de respondedores al tratamiento con inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (iPDE5), con una mejoría significativa de su DE (IIEF =  $49,4 \pm 17,29$ ; IIEF-FE =  $18,5 \pm 9,60$  puntos), calidad de vida sexual y ansiedad, con un mayor porcentaje de respondedores entre los genotipos homocigoto nativos -786-TT y el 864-TT.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [peiro.ana@gva.es](mailto:peiro.ana@gva.es) (A.M. Peiró).

**Conclusión:** Las variantes del gen *NOS3* podrían influir en la respuesta a iPDE5. Se requerirá el análisis completo de la muestra del paciente para confirmar estos resultados preliminares.

© 2020 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## KEYWORDS

Erectile dysfunction;  
Cardiovascular  
disease;  
*eNOS* gene;  
iPDE5

## Erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease and the potential influence of genetic markers

### Abstract

**Introduction:** The association between erectile dysfunction (ED) and cardiovascular disease (CVD) is well known, the latter being an early independent risk factor that can appear up to 5 years before the onset of cardiovascular symptoms. The enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) could be implicated in its pathophysiology as an endogenous vasodilator. Our objective was to analyse the influence of variants of the *eNOS* gene, in the response to treatment of ED, in patients with CVD.

**Methodology:** Observational, prospective study in patients with ED of the Cardiac Rehabilitation Programme. Demographic variables were collected (International Index of Erectile Function (IIEF), quality of sexual life (mSLQQ), anxiety and depression (HAD), along with cardiovascular risk factors (CVRF). Genetic analysis of polymorphisms T-786C, G894T of the *eNOS* gene was performed by RT-PCR with TaqMan probe, and the data were analysed using SPSS 25.

**Results:** Patients ( $n = 35$ ,  $60.8 \pm 8.44$  years) showed a median CVD (IQR 1-3) with severe ED (IIEF-EF of  $9.4 \pm 6.73$  points) and a low perception of their quality of sexual life ( $-19.4 \pm 8.37$  points). At the final visit ( $n = 15$ ), there were 71% responders to treatment with iPDE5, with a significant improvement in their ED (IIEF =  $49.4 \pm 17.29$ , IIEF-FE =  $18.5 \pm 9.60$  scores) and of their quality of sexual life ( $7 \pm 12$  scores), with a higher percentage of responders among the native homozygous genotypes -786-TT and 864-TT.

**Conclusion:** Variants of the *NOS3* gene could influence the response to iPDE5. Full analysis of the patient sample will be required to confirm these preliminary results.

© 2020 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

La disfunción eréctil (DE) es un trastorno definido como la imposibilidad de conseguir o mantener una erección que permita unas relaciones sexuales satisfactorias<sup>1</sup>. Esta disfunción llega a afectar a cerca de dos millones de españoles puesto que, en el estudio nacional EDEM<sup>2</sup>, entre el 12 y el 19%, según el IIEF, de los varones entre 25 y 70 años, presentan algún grado de DE (16% mínima, 2% moderada y 1% severa). Dicha prevalencia aumenta con la edad (8,6% en varones de 25 a 39 años, 13,7% de 40-49 años, 24,5% entre 50 y 59 años y 49% en sujetos de 60 a 70 años). Sin embargo, sigue siendo un trastorno infradiagnosticado e infratratado, lo cual es relevante ya que se considera a la DE un signo centinela de enfermedad cardiovascular (ECV) que puede llegar a precederla hasta en unos cinco años, considerándose una manifestación temprana de aterosclerosis y disfunción endotelial<sup>3</sup>.

Tanto la DE como la ECV comparten factores de riesgo (hipertensión arterial [HTA], diabetes mellitus [DM], dislipemia [DL] y tabaquismo)<sup>4</sup>. Por lo tanto, es importante una detección temprana junto a un adecuado tratamiento para mejorar tanto su calidad de vida sexual, como la prevención de eventos cardiovasculares.

## Fisiología de la erección e implicación del gen eNOS

El óxido nítrico (NO) se considera un nitrovasodilatador endógeno, puesto que estimula la guanilil ciclasa para producir monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), causando vasodilatación del músculo liso vascular y de los cuerpos cavernosos. Este fenómeno aumenta el flujo sanguíneo, que queda atrapado en los sinusoides venosos, al quedar los plexos venosos comprimidos contra la túnica albugínea, impidiendo el retorno venoso disminuido<sup>5</sup>. Diversas publicaciones muestran que el NO puede actuar, a nivel del sistema nervioso central, en el comportamiento sexual y erección peneana. La producción de NO aumenta durante las erecciones. Además, la inyección en el núcleo paraventricular de inhibidores de la NO sintasa (L-NAME) inhibe la erección producida por dopamina, oxitocina o NMDA. Esta inhibición no se observa si se inyecta además L-arginina, el sustrato para la producción de NO<sup>6</sup>. Múltiples modelos animales de DE con diabetes 1 y 2 tienen disminuida la vasodilatación del tejido cavernoso dependiente del endotelio a consecuencia de una menor producción de ON<sup>7</sup>. Por tanto, una menor síntesis de la enzima óxido nítrico endotelial sintasa (eNOS) o una menor actividad de esta, se ha relacionado con la DE y otras patologías asociadas con la disfunción endotelial

(hipertensión arterial [HTA], nefropatía y retinopatía diabética, obesidad, migraña, preeclampsia)<sup>8,9</sup>.

El gen que codifica para esta enzima, el *NOS3*, se encuentra en el cromosoma 7q36. De todos, hay dos *loci* polimórficos que se han asociado con una menor actividad con consecuencias clínicas: (i) *G894T* en el exón 7: condiciona un cambio de glutamato en la posición 298 a aspartato y posee una menor actividad biológica por un defecto en el transporte y una mayor afinidad a la caveolina 1, que posee una función inhibidora sobre la eNOS<sup>10</sup>; (ii) *T-786C* en la región promotora: produce un sitio de unión para la proteína A1 que bloquea la expresión de la enzima eNOS en un 50%<sup>10</sup>. También se ha relacionado el genotipo de la *NOS3* con diferencias en la respuesta al tratamiento de la DE con sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (iPDE5)<sup>11</sup>, la respuesta al tratamiento antihipertensivo con enalapril<sup>12</sup> y un aumento de nitritos en sangre inducido por el tratamiento con atorvastatina<sup>13</sup>. Por este motivo, sería de interés analizar si la respuesta al tratamiento de la DE con inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (iPDE5) podría variar según el genotipo de los pacientes.

El objetivo del estudio fue el de analizar el genotipo de los pacientes, tanto como marcador de riesgo de ECV como de diferente respuesta al tratamiento con iPDE5, así como implementar una vía de derivación clínica entre las unidades de Cardiología y Andrología para favorecer el tratamiento de la DE y conseguir una mayor calidad de vida sexual en estos pacientes.

## Métodos

### Diseño y población de estudio

Se diseñó un estudio observacional, prospectivo y unicéntrico, en el que se incluían todos los pacientes en el Programa de Rehabilitación Cardíaca del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA), con ECV (angina inestable [AI] o infarto agudo de miocardio [IAM]), que presentaban DE y por tanto, iban a ser derivados a la consulta de Andrología por rutina clínica para recibir tratamiento con iPDE5. Los criterios de inclusión fueron: pacientes varones de más de 30 años, con antecedente de enfermedad cardiovascular y pareja estable. Los criterios de exclusión fueron: contraindicaciones para el tratamiento con iPDE5 (tratamiento con nitratos, IAM hace menos de seis meses), hipoactividad sexual y abuso de drogas. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica con medicamentos (CEIm) del Departamento de Salud de Alicante-Hospital General (DSA-HG).

### VARIABLES ANALIZADAS

Se realizó una anamnesis e historia clínica detallada. Se preguntó sobre la calidad de las erecciones, las posibilidades de penetración, la capacidad de mantener la erección y su presencia en otras situaciones. Los pacientes cumplimentaron el cuestionario Índice Internacional de Función Eréctil (IIEF), que consta de preguntas que abarcan: función eréctil (IIEF-FE), función orgásmica, deseo sexual, satisfacción con la relación sexual y satisfacción general. El grado de DE (subdominio IIEF-FE) va de 1 a 30 puntos y clasifica la DE

en: severa 1-10 puntos, moderada 11-16 puntos, leve 17-25 puntos y sin DE 26-30 puntos<sup>14,15</sup>.

Se cumplimentó un cuestionario sobre calidad de vida sexual (*Sexual Life Quality Questionnaire*, mSLQQ), una herramienta multidimensional en la que se pide a los pacientes y sus parejas que comparen sus experiencias antes de la aparición de la DE en 10 subescalas de evaluación: frecuencia del sexo, la duración de las relaciones sexuales, la facilidad de penetración, la facilidad de alcanzar el orgasmo; la facilidad de iniciar las relaciones sexuales, el placer de la anticipación, sentimientos sin preocupaciones durante las relaciones sexuales, placer del orgasmo, placer total y placer a su pareja. Una puntuación de 0 indica que no hay cambios, < 0 y > 0 puntos indican un empeoramiento o mejoría, respectivamente. Por otra parte, se realizó el test de Escala Hospitalaria de Ansiedad (HAD-A) y Depresión (HAD-D), clasificándose según la puntuación en «no caso» (< 7), «posible caso» (8-10) y caso (> 11).

Se realizaron analíticas sanguíneas o se recuperaron los datos de analíticas recientes de los últimos seis meses que incluyeran glucosa plasmática, triglicéridos y colesterol en sangre. También se registraron otros valores analíticos según la disponibilidad (creatinina, velocidad de filtración glomerular, urea, transaminasas, bilirrubina, hemoglobina glicosilada, testosterona, hormona foliculoes-timulante [FSH] y hormona luteinizante [LH]). Se definió como hipertrigliceridemia un valor de triglicéridos en sangre superior a 150 mg/dL o un diagnóstico previo de hipertrigliceridemia y como hipercolesterolemia un colesterol total en sangre superior a 200 mg/dL o un diagnóstico previo de hipercolesterolemia. Se consideraron como dislipémicos a los pacientes con hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia. Aquellos que estaban en tratamiento antihipertensivo o tenían un diagnóstico previo de hipertensión arterial se catalogaron como hipertensos. Aquellos que presentaron una glucosa plasmática en ayunas superior a 126 mg/dL en dos ocasiones o tenían un diagnóstico y/o tratamiento previo hipoglucemiante se catalogaron como diabéticos. Se consideraron como obesos los pacientes con un índice de masa corporal (IMC) superior a 30 kg/m<sup>2</sup>. Se registraron además todos los fármacos que pudieran estar implicados en la DE.

Se recogieron 2 mL de saliva en tubos con 6 mL de solución salina. Tras la extracción del ADN de las muestras de saliva, se procedió a la determinación de las variantes genéticas *T-786C* (rs2070744) y *G894T* (rs1799983) del gen *eNOS* mediante RT-PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction) con sonda TaqMan.

### Procedimiento clínico

Se realizaron dos visitas más, a los tres y seis meses, repitiendo los cuestionarios en la tercera visita y reajustando el tratamiento en caso de que no hubiera respuesta. En las visitas se compararon las diferencias en las puntuaciones en las escalas, entre la visita final y basal. Además, se dividieron a los pacientes en respondedores y no respondedores, según el cambio en la puntuación en la escala IIEF fuera superior o inferior a la mediana, respectivamente, y se analizaron las prevalencias de los distintos genotipos en cada grupo. Para valorar el riesgo cardiovascular se comparó la

edad de aparición del primer episodio cardiovascular según el genotipo.

## Análisis estadístico

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar o como mediana y rango intercuartílico para parámetros que no se ajusten a una distribución normal. Se empleó la prueba de U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de variables continuas y el test exacto de Fisher para la comparación de variables categóricas. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 25 para Windows®. Se estableció el nivel de significación estadística cuando  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

### Datos demográficos y clínicos

Se han derivado a la consulta de andrología 36 pacientes, de los cuales, 35 han sido incluidos para el estudio. Se ha realizado el estudio genético en 27 de esos pacientes, estando el resto pendiente. Han completado el estudio hasta la visita final 15 pacientes. Los datos clínicos y analíticos de la muestra están resumidos en la [tabla 1](#).

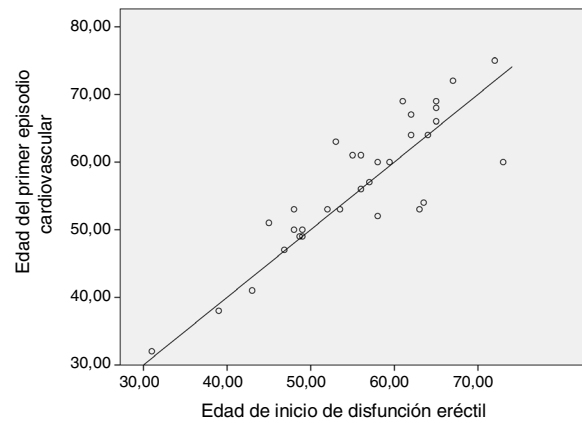
Los pacientes ( $60,8 \pm 8,44$  años, 56% exfumador, 82% hipertensos, 76% dislipemia, 56% con síndrome metabólico) presentaron una mala calidad de vida sexual, con una puntuación negativa en el test mSLQQ. El 70% (19/27) mostraban una DE severa, con una puntuación IIEF-FE menor o igual a 10. En la mayor parte no existía una comorbilidad de ansiedad ni de depresión. El primer ECV lo había tenido una media de cinco años antes.

### Respuesta al tratamiento e influencia del genotipo

Tras la derivación a la Unidad de Andrología y el tratamiento con iPDE5 (100%), la mediana de cambio en la puntuación IIEF-FE fue de 10,5 (RIC 0,0 a 20,5) puntos. En la [tabla 2](#), se muestra que el 71% de los pacientes mostraron mejoría en la función eréctil, mientras que el 29% no mostró ningún cambio. Sin embargo, la diferencia en la puntuación de la escala IIEF y IIEF-FE entre la visita final y basal no fue significativa ( $p = 0,088$  y  $0,228$ ).

Las distribuciones de los alelos no difieren del equilibrio de Hardy Weinberg ( $p$ -valor 0,83 y 0,14 para T-786C y G894T, respectivamente). Se encontró una tendencia a la mejor respuesta clínica entre los genotipos homocigoto nativos 786-TT (100% respondedores) y el 864-TT (100% respondedores), sin ser significativas entre los distintos genotipos ( $p = 0,537$  para el polimorfismo T-786C y  $p = 0,552$  para el polimorfismo G894T) tal vez por el escaso tamaño muestral ([tabla 3](#)).

En la [figura 1](#) se muestra la edad de inicio de DE frente a la edad de aparición del primer ECV, siendo los pacientes que están a la izquierda de la línea diagonal los que han presentado DE como síntoma centinela de ECV. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos según el genotipo. Se espera realizar un seguimiento de



**Figura 1** Edad de inicio de disfunción eréctil (DE) frente a la edad de aparición del primer episodio cardiovascular.

los pacientes a cinco años y valorar la aparición de nuevos ECV y mortalidad.

## Discusión

Los resultados de la muestra actual tienen una tendencia a una mejor respuesta al tratamiento con iPDE5 según el genotipo de los pacientes con DE y ECV. Este resultado debería confirmarse para poder incluir a estas variantes del gen *eNOS* como marcadores farmacogenéticos.

Existen múltiples estudios farmacogenéticos valorando la respuesta a sildenafil en individuos con DE. Actualmente, los genes más prometedores, con implicaciones farmacogenéticas, están relacionados con el óxido nítrico y la vía GMPc, aunque es probable que otros genes afecten la capacidad de respuesta al tratamiento de la DE. El cambio de glutamato por aspartato en la posición 298 (g.894G > T) se relacionó con una peor respuesta a sildenafil en pacientes hipertensos, pero esa peor respuesta no se mantuvo cuando se incluyeron pacientes normotensos<sup>16</sup>. En estos dos casos, una menor actividad de la eNOS se relacionó con una menor respuesta a sildenafil. Sin embargo, los pacientes con el genotipo del 786T > c mutado (786C), con una expresión y una actividad menor de la eNOS, tienen una mejor respuesta a sildenafil. En dicho trabajo de Eisenhardt et al., los pacientes con el genotipo del 786T > c mutado (786C), con una expresión y una actividad menor de la eNOS, tienen una mejor respuesta a sildenafil, lo cual parece contradecir los resultados anteriores y la hipótesis inicial de que una mayor actividad de la eNOS y por lo tanto una mayor biodisponibilidad de NO implicaría una mayor respuesta al tratamiento con iPDE5. También existen otras variantes como el genotipo 4 b del VNTR, del intrón 4, que se ha relacionado con una peor respuesta en pacientes prostatectomizados en población brasileña, pero no así en pacientes con DE orgánica<sup>11</sup>. En un estudio en población turca el genotipo 4 b era más prevalente en pacientes con mala respuesta, sin embargo, esta respuesta se definió únicamente como la puntuación después del tratamiento con sildenafil, sin tener en cuenta la situación inicial<sup>11</sup>.

Hay otros aspectos para tener en cuenta a la hora de valorar estos resultados porque todavía no se conocen adecuadamente las relaciones entre los distintos polimorfismos

**Tabla 1** Características clínicas y analíticas. Datos en porcentaje y media ± desviación estándar

Variables	Total (n = 35)	Genotipados (n = 15)
Edad (años)	60,8 ± 8,4	59,3 ± 7,8
Fumadores		
Si	19%	13%
Ex-fumador	56%	47%
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28,5 ± 5,3	28,9 ± 5,9
HTA	82%	80%
Diabetes mellitus	44%	47%
Dislipemia	76%	60%
Obesidad	36%	50%
Síndrome metabólico	59%	53%
Colesterol total (mg/dL)	128,8 ± 26,3	128,6 ± 23,6
Colesterol HDL (mg/dL)	44,7 ± 16,21	44,5 ± 19,2
Triglicéridos (mg/dL)	129,5 ± 55,1	117,4 ± 35,4
Creatinina (mg/dL)	1,2 ± 0,8	1,1 ± 0,2
Edad inicio disfunción eréctil (años)	56,1 ± 9,7	52,7 ± 10,0
Edad 1 <sup>er</sup> episodio cardiovascular (años)	56,9 ± 9,6	53,5 ± 11,3
IIEF (puntos)	33,3 ± 12,7	32,3 ± 12,6
IIEF-FE (puntos)	9,5 ± 6,7	8,7 ± 6,8
mSLQQ (puntos)	-19,4 ± 8,4	-23,0 ± 8,9
HADA (puntos)		
No caso	61%	67%
Posible caso	28%	20%
Probable caso	11%	13%
HADD (puntos)		
No caso	89%	87%
Posible caso	6%	0%
Probable caso	6%	13%

IIEF = International Index of Erectile Function. IIEF-FE = International Index of Erectile Function, Función Eréctil. mSLQQ = Sexual Life Quality Questionnaire HADA = Hospital Anxiety and Depression, Anxiety. HADD = Hospital Anxiety and Depression, Depression.

**Tabla 2** Puntuaciones basales y respuesta al tratamiento según el genotipo

Genotipo	IIEF basal Mediana (RIC)	IIEF final Mediana (RIC)	IIEF FE basal Mediana (RIC)	IIEF FE final Mediana (RIC)	ΔIIEF FE Mediana (RIC)	P-valor
T-786C						
TT (2)	27 (26 a 36)	59 (53 a 65)	8,5 (7 a 11)	24,5 (22 a 27)	16,5 (13 a 20)	0,537*
TC (4)	39 (27 a 47)	54,5 (42 a 59,5)	7 (5 a 24)	21 (13 a 25)	6,5 (0 a 15)	
CC (8)	31,5 (20 a 41)	47,5 (38,5 a 63)	5,5 (5 a 8)	15 (8,5 a 28,5)	5 (1 a 22,5)	
G894T						
GG (11)	29 (26 a 41)	53 (47 a 63)	5,5 (5 a 9)	22 (10 a 28)	8 (0 a 22)	0,552*
GT (2)	28 (5 a 39)	29 (5 a 53)	7 (1 a 10)	10,5 (1 a 20)	6,5 (0 a 13)	
TT (1)	35 (27 a 36)	65	8 (7 a 11)	27	20	

IIEF = International Index of Erectile Function. IIEF-FE = International Index of Erectile Function, Función Eréctil.

\* Test de Kruskal-Wallis comparando la diferencia en la escala IIEF-FE entre la visita final y la visita inicial entre los distintos genotipos.

**Tabla 3** Pacientes respondedores al tratamiento con inhibidores de la fosfodiesterasa 5 según genotipo eNOS analizado

eNOS	Genotipo	Respondedores	P-valor
T-786			
	TT (2)	100% (2)	0,287
	TC (4)	50% (2)	
	CC (8)	37,5% (3)	
G984T			
	GG (11)	45% (5)	0,58
	GT (2)	50% (1)	
	TT (1)	100% (1)	

Test de Kruskal-Wallis comparando la tasa de respondedores entre los diferentes genotipos.

y el análisis de haplotipos valorando en su conjunto todas las variantes analizadas<sup>17</sup>. Además, la acción del sildenafil requiere una mínima cantidad de NO para ejercer su función y esta debería ser evaluada en los trabajos. Los datos indican que con niveles menores de NO plasmático la respuesta a sildenafil es mayor, aunque se requiere una mínima cantidad de NO para que haya una respuesta clínica. También hay otros genotipos candidatos, por ejemplo, existe también un polimorfismo de la eNOS más reciente y menos estudiado, 665C >T, que se ha relacionado con la presencia de hipertensión arterial<sup>18</sup> y otros, como son la nNOS, VEGF, ECA, GNB3 y el CYP3A5\*3 implicado en el metabolismo del sildenafil, vardenafil y udenafil<sup>19</sup>. Debido a esto podemos estar sobreestimando la asociación de diversos genotipos con factores de riesgo o patologías<sup>20</sup>. En el caso de que si que se diera la asociación de ciertos polimorfismos con FRCV el papel del gen NOS3 como marcador de riesgo independiente estaría bien. Nos planteamos que estos datos podrían ser útiles para valorar el efecto de dichos polimorfismos pueden tener un efecto acumulativo sobre el RCV independiente de otros FRCV o si el aumento de la morbi-mortalidad se debe exclusivamente al efecto de las FRCV tradicionales.

Además, el estudio cuenta con una serie de limitaciones. En primer lugar, el tamaño muestral es pequeño y eso conlleva el número reducido de sujetos en algunos grupos de genotipos; además la población de estudio, con enfermedad cardiovascular establecida (muchos con un infarto reciente), tiene unas características especiales que podrían no ser aplicables a la población general: 1) ya son considerados pacientes con un alto riesgo cardiovascular y enfermedad vascular establecida, 2) están en tratamiento con múltiples fármacos, algunos de los cuales tienen efecto sobre la función eréctil (betabloqueantes), contraindican el tratamiento con iPDE5 y no pueden ser incluidos (nitratos) o afectan a los valores analíticos (estatinas) no permitiendo valorar la displipemia como factor de riesgo de DE o incluirla en el análisis multivariante, 3) han sufrido un evento estresante y el factor psicológico afecta a su calidad de vida sexual y a su función sexual. La mayor parte de los pacientes tuvieron DE a raíz del evento cardiovascular en lugar de presentarse como un síntoma centinela de arteriosclerosis. En segundo lugar, para valorar el genotipo como FRCV es necesario realizar un seguimiento a largo plazo y medir la incidencia de nuevos eventos cardiovasculares y su potencial morbimortalidad.

## Conclusiones

Se ha conseguido una vía de derivación clínica entre las unidades de Cardiología y Andrología consiguiendo una tasa de respuesta al tratamiento de la DE del 71%. Los datos actuales permiten observar una tendencia en la respuesta al tratamiento con iPDE5 según el genotipo eNOS, requiriéndose para esto el análisis de la muestra completa. Los datos recogidos permitirán realizar un análisis multivariante de riesgo cardiovascular según el genotipo de los pacientes para ver si puede ser un factor de riesgo independiente.

En cuanto a la aplicabilidad de la genética en la clínica, en relación con el gen NOS3, no hay datos suficientes para utilizarlo como marcador de riesgo cardiovascular y su posible efecto parece estar sobreestimado en los estudios

debido a un sesgo de publicación. Además, su influencia sobre el tratamiento no parece ser clínicamente significativa ya que los pacientes pueden responder al tratamiento con iPDE5 independientemente de su genotipo, siendo más importante su estado vascular.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Lue TF. Erectile Dysfunction. *N Engl J Med.* 2000;342:1802–13, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200006153422407>.
2. Govier FE, McClure RD, Kramer-Levien D. Endocrine Screening for Sexual Dysfunction Using Free Testosterone Determinations. *J Urol.* 1996;156:405–8, <http://dx.doi.org/10.1097/00005392-199608000-00018>.
3. Vlachopoulos C, Rokkas K, Ioakeimidis N, Aggeli C, Michaelides A, Roussakis G, et al. Prevalence of asymptomatic coronary artery disease in men with vasculogenic erectile dysfunction: a prospective angiographic study. *Eur Urol.* 2005;48:996–1002, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2005.08.002>.
4. Jackson G. Prevention of Cardiovascular Disease by the Early Identification of Erectile Dysfunction. *Int J Impot Res.* 2008;20:59–14, <http://dx.doi.org/10.1038/ijir.2008.47>.
5. Gratzke C, Angulo J, Chitale Y, Dai YT, Kim NN, Paick JS, et al. Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *J Sex Med.* 2010;7:445–75, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01624.x>.
6. Melis MR, Succu S, Mauri A, Argiolas A. Nitric oxide production is increased in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats during non-contact penile erections and copulation. *Eur J Neurosci.* 1998;10:1968–74, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00207.x>.
7. Bozkurt NB, Pekiner C. Impairment of endothelium- and nerve-mediated relaxation responses in the cavernosal smooth muscle of experimentally diabetic rabbits: role of weight loss and duration of diabetes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2006;373:71–8, <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-006-0038-5>.
8. Niu W, Qi Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *PLoS one.* 2011;6:e24266, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024266>.

9. Vecoli C. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in cardiovascular disease. *Vitam horm.* 2014;96:387–406, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800254-4.00015-5>.
10. 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;21:2655–63, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7088com>.
11. Muniz JJ, Lacchini R, Rinaldi TO, Nobre YTDA, Cologna AJ, Martins ACP, et al. Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction. *Pharmacogenomics J.* 2013;13:189–96, <http://dx.doi.org/10.1038/tpj.2011.49>.
12. Silva PS, Fontana V, Luizon MR, Lacchini R, Silva WA Jr, Biagi C, et al. eNOS and BDKRB2 genotypes affect the antihypertensive responses to enalapril. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69:167–77, <http://dx.doi.org/10.1007/s00228-012-1326-2>.
13. Nagasaki S, Sertório JT, Metzger IF, Bem AF, Rocha JBT, Tanus-Santos JE. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Rad Biol Med.* 2006;41:1044–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.026>.
14. Rosen RC, Cappelleri JC, Smith MD, Lipsky J, Peña BM. Development and evaluation of an abridged, 5-item version of the International Index of Erectile Function (IIEF-5) as a diagnostic tool for erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 1999;11:319–26, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijir.3900472>.
15. Cappelleri JC, Rosen RC. Reply to «The sexual health inventory for men (IIEF-5)» by JA Vroege. *Int J Impot Res.* 1999;11:353–4, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijir.3900481>.
16. Eisenhardt A, Sperling H, Hauck E, Porst H, Stief C, Rübbergen H, et al. ACE gene I/D and NOS3 G894T polymorphisms and response to sildenafil in men with erectile dysfunction. *Urology.* 2003;62:152–7, [http://dx.doi.org/10.1016/s0090-4295\(03\)00137-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0090-4295(03)00137-7).
17. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med.* 2005;56:303–20, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.56.082103.104540>.
18. Salvi E, Kutalik Z, Glorioso N, Benaglio P, Frau F, Kuznetsova T, et al. Genomewide association study using a high-density single nucleotide polymorphism array and case-control design identifies a novel essential hypertension susceptibility locus in the promoter region of endothelial NO synthase. *Hypertension.* 2012;59:248–55, <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.181990>.
19. Lacchini R, Tanus-Santos JE. Pharmacogenetics of erectile dysfunction: navigating into uncharted waters. *Pharmacogenomics.* 2014;15:1519–38, <http://dx.doi.org/10.2217/pgs.14.110>.
20. Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BMY, Baum L, Yamada Y, Oliveira PSL, et al. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J Hypertens.* 2007;25:1763–74, <http://dx.doi.org/10.1097/HJH.0b013e3281de740d>.









## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Speranza Rubattu,  
Sapienza University of Rome, Italy

## REVIEWED BY

Arun Samidurai,  
Virginia Commonwealth University,  
United States  
Francesco Sessa,  
Department of Clinical and Molecular  
Medicine, University of Catania, Italy

## \*CORRESPONDENCE

Ana M. Peiró  
✉ peiro\_ana@gva.es

<sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work and share first authorship

RECEIVED 25 September 2023

ACCEPTED 19 February 2024

PUBLISHED 21 March 2024

## CITATION

Agulló L, Segura A, Ortuño-Miquel S, Brinca AT, Micol-Ponce R, Arrarte V, Ponce MR, Miró-Martínez P, Zandonai T and Peiró AM (2024) Circulating miRNA-21 is an innovative biomarker for cardiovascular events in erectile dysfunction patients.  
Front. Cardiovasc. Med. 11:1301925.  
doi: 10.3389/fcvm.2024.1301925

## COPYRIGHT

© 2024 Agulló, Segura, Ortuño-Miquel, Brinca, Micol-Ponce, Arrarte, Ponce, Miró-Martínez, Zandonai and Peiró. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Circulating miRNA-21 is an innovative biomarker for cardiovascular events in erectile dysfunction patients

Laura Agulló<sup>1,2†</sup>, Ana Segura<sup>3†</sup>, Samanta Ortuño-Miquel<sup>4</sup>, Ana Teresa Brinca<sup>5</sup>, Rosa Micol-Ponce<sup>2</sup>, Vicente Arrarte<sup>6</sup>, María Rosa Ponce<sup>2</sup>, Pau Miró-Martínez<sup>7</sup>, Thomas Zandonai<sup>1,8</sup> and Ana M. Peiró<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmacogenetic Unit, Clinical Pharmacology Department, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), Dr. Balmis General University Hospital, Alicante, Spain, <sup>2</sup>Institute of Bioengineering, Miguel Hernández University, Elche, Spain, <sup>3</sup>Andrology Unit, Urology Department, Dr. Balmis General University Hospital, Alicante, Spain, <sup>4</sup>Bioinformatics Department, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), Dr. Balmis General University Hospital, Alicante, Spain, <sup>5</sup>Health Sciences Research Centre, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal, <sup>6</sup>Cardiology Department, Dr. Balmis General University Hospital, Alicante, Spain, <sup>7</sup>Department of Statistics and Operational Research of the Alcoy Campus of Universitat Politècnica de València, Alicante, Spain, <sup>8</sup>Addiction Science Lab, Department of Psychology and Cognitive Science, University of Trento, Rovereto, Italy

**Introduction:** It is well-known that circulating microRNAs (miRNAs) play a relevant role in many kinds of diseases by regulating the expression of genes involved in various pathophysiologic processes, including erectile dysfunction (ED) and cardiovascular diseases (CVD).

**Purpose:** This study aimed to identify the miRNA-21 profile in the blood samples of patients with ED, CVD, and the combination of both pathologies to elucidate the potential function of miRNA-21.

**Methods:** A total of 45 patients with CVD and/or who underwent the erectile function test were included and divided into the following categories: CVD with ED (cases,  $n = 29$ ) and controls ( $n = 16$ ) with either ED or CVD. Real-time polymerase chain reaction analysis verified the results. miRNA-21 expression was quantified, and informatics analysis was applied to predict the functions of this differentially expressed miRNA-21.

**Results:** A total of 64% of cases ( $63 \pm 9$  years, 66% with severe ED, 56% with CV ejection fraction) first presented ED as the sentinel clinical manifestation. Serum miRNA-21 levels in the control ED were significant, up to 10-fold higher than in the CVD controls and cases. A significant inverse ( $p = 0.0368$ ,  $\beta = -2.046$ ) correlation was found between erectile function and miRNA-21 levels.

**Conclusions:** Our study provides comprehensive insights into the functional interaction between miRNA-21 and ED in CVD patients. Its relevance lies in the potential of miRNA as a biomarker to be applied in the cardiovascular predictive medicine field.

## KEYWORDS

cardiovascular disease, erectile dysfunction, genomic biomarkers, circulating miRNA, miRNA-21

## 1 Introduction

Male erectile dysfunction (ED) is notably prevalent in patients diagnosed with cardiovascular diseases (CVD). Both conditions share common risk factors and pathophysiological connections, such as endothelial dysfunction, which is commonly attributed to the age-related degeneration of penile erectile tissue or deficiency in male hormonal levels (1, 2). In fact, ED has been shown to be an early independent factor of future CVD events (3, 4), which suggests an important pathway to initiate preventive measures. Furthermore, although data indicate that pharmacological treatment of ED affects the risk of CVD, adverse events related to sexual dysfunction drugs are a major contributing harbinger of poor adherence to therapy (5). Therefore, screening for ED is essential to prevent CVD by offering an easy prognostic tool (6–9).

For the last 20 years, microRNAs (miRNAs) have been studied in connection to the post-transcriptional regulation of gene expression in critical cardiac physiological and pathological processes (10). miRNAs are short non-coding transcripts of approximately 22 nucleotides. Post-transcriptional gene regulation at the gene expression level is significantly promising as a diagnostic and therapeutic approach for managing various diseases (11, 12). By interrupting protein synthesis, miRNAs can effectively turn genes off and influence many fundamental processes in the body, such as developmental and apoptotic behaviors of cells and cardiac organogenesis. A recent systematic review of 59 articles on experimental studies involving human samples has evidenced that miRNAs can be a powerful gene regulator in CVD (13). Moreover, anomalies in miRNA expression profiles have been noted in the corpus cavernosum of both aging rats with ED and diabetic mice (7), where the upregulation of miRNA-200a can attenuate endothelial function with an impact on atherosclerotic plaques (14). In fact, simvastatin prevented a decrease in isoenzyme eNOS (endothelial nitric oxide synthase) expression while decreasing miRNA-155 levels (15). Overall, the link between miRNA-21 expression and ED and CVD is poorly established in the literature. Some data suggest the possibility of using nanoparticle miRNA-21 delivery to attenuate post-myocardial remodeling by reducing hypertrophy, fibrosis, and cell apoptosis in the remote myocardium (16). Therefore, miRNAs might be implicated in contributing to the pathogenesis of ED and could represent a potential future therapeutic strategy.

This clinical study aims to analyze the expression levels of miRNA-21 in the serum samples of patients with CVD and/or ED to elucidate the intricate pathways underlying endothelial dysfunction.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study design

A prospective study was designed and conducted at the Cardiology Rehabilitation Centre and Andrology Unit in the Department of Health of Dr. Balmis General University Hospital of Alicante, Spain from March 2022 to June 2023. The study was approved by the Research Ethics Committee (Protocol code: PI2022-114). After

obtaining approval from the Ethics and Research and Development committee, 84 men with CVD and/or ED were recruited from the Cardiac Rehabilitation Centre and Andrology Unit of the Department of Health of Dr. Balmis General University Hospital of Alicante. Among them, those with blood samples were finally included ( $n = 45$ ). All the participants received detailed information about the study design and its objectives from their healthcare provider, and written informed consent was duly obtained. Inclusion criteria were the following: patients older than 18 years, with a diagnosis of ED [“erectile function” domain of the International Index of Erectile Function (IIEF-EF) questionnaire  $\leq 25$ ], and/or being assisted in the Cardiology Unit. Individuals were excluded if they had been previously diagnosed with conditions affecting the brain, spinal cord, or pelvic nerves (e.g., multiple sclerosis, multisystem atrophy, spinal cord injury, and tumors), conditions affecting the cauda equina (such as prolapsed intervertebral discs or tumors), and diseases affecting the parasympathetic nerves within the pelvis. In addition, individuals who had received extensive surgery to the pelvis or abdomen and individuals diagnosed with conditions such as chronic renal failure, hyperprolactinemia, hypogonadism, smooth muscle dysfunction, and Peyronie’s disease were also excluded.

Professional nurses interviewed all the participants who attended cardiac rehabilitation programs using a standardized interview and a structured questionnaire that covered socio-demographic and clinical characteristics. High-risk CVD individuals were included if they had a history of myocardial infarction or angina. Following the collection of questionnaire data, the patients who mentioned any sexual dysfunction were referred to the Andrology Unit for diagnosis and treatment. The age of the patients ranged from 37 to 76 years, and none were taking hormone medication (supplementation or deprivation) or any phosphodiesterase type 5 (iPDE5) inhibitors before being included in the present study. Prescriptions were made as usual in the Andrology Unit for ED management and included iPDE5 (sildenafil, tadalafil, avanafil or vardenafil). A health professional also completed a medical details questionnaire. All patients underwent a thorough medical examination, including a review of their medical and drug history.

### 2.2 Clinical outcomes

To evaluate male sexual function, particularly the presence or absence of ED, the IIEF questionnaire was utilized. The IIEF comprises 15 items that are categorized into five domains of sexual function: erectile function (EF), orgasmic function, sexual desire, satisfaction with sexual intercourse, and overall satisfaction. In this questionnaire, higher scores indicate lower dysfunction levels. The domain that assesses erectile function (IIEF-EF) comprises six questions with a maximum score of 30 and serves as a reliable tool for categorizing the degree of ED as severe (1–10), moderate (11–16), mild (17–25), and normal or no dysfunction ( $\geq 26$ ) (17).

In addition, patients were instructed to fill out a questionnaire related to their sexual quality of life, namely, the Sexual Life Quality

Questionnaire (mSLQQ). The mSLQQ is a comprehensive tool that allows patients and their partners to compare their experiences before the onset of ED with their experiences since treatment onset. This questionnaire comprises 10 assessment items that cover aspects such as frequency and duration of sexual activity, ease of penetration, ease of achieving orgasm, initiation of sexual encounters, pleasure of anticipation, carefree feelings during sexual activity, pleasure derived from orgasm, overall satisfaction, and partner's satisfaction (18, 19).

The psychological status was assessed in accordance with the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS), which scores from 0 to 21. The scores are classified as normal (<7), probable (8–10), and case (>11) (20, 21).

At the time of inclusion, the cardiovascular ejection fraction was recorded. According to the American Heart Association, an ejection fraction of about 50%–70% is categorized as normal, a mild fraction is 41%–49%, and a reduced ejection fraction is 40% or lower.

## 2.3 Sample collection and plasma processing

Samples from patients included in this study were provided by the BioBank ISABIAL, adhered to the Spanish National Biobanks Network and integrated in the Valencian Biobanking Network and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethical and Scientific Committees. Blood samples were collected in vacutainers containing EDTA. Then, samples were immediately centrifuged for plasma separation at 3,000×g for 10 min. After phase separation, plasma was collected and divided into two aliquots, quickly frozen, and preserved at –80° C until the RNA isolation process. The total RNA from blood samples was isolated using the miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) according to the manufacturer's instructions. The purity and concentration of the RNA samples were assessed spectrophotometrically by a NanoDrop ND-2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA).

## 2.4 miRNA quantitative real-time PCR

First-strand complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out with 10 ng of total RNA from each sample with the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocol. cDNA was amplified using TaqMan Universal MasterMix II (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in a QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) assays were performed in triplicate on diluted cDNA templates using specific TaqMan MicroRNA assays for hsa-miR-21-5p (Assay ID: 000397) and RNU6B (Assay ID: 001093) (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The relative quantification of the miRNA expression levels was performed according to the 2- $\Delta\Delta C_t$  method (22). Quantitative results were obtained using RNU6B as an endogenous reference for normalization.

## 2.5 Data analysis

The Shapiro–Wilk normality test was performed for fewer than 50 samples. In contrast, the Kolmogorov–Smirnov normality test was used to determine whether to apply a parametric or non-parametric test for comparisons. The quantitative data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). The categorical variables are expressed as total numbers and percentages. Demographic and clinical data were compared using either the  $\chi^2$  or Fisher's exact test for the categorical variables, depending on the sample size of groups, and the *t*-test or Mann–Whitney *U* test for the continuous variables, depending on their distribution. When more than two groups were involved, ANOVA or Kruskal–Wallis tests were used for the continuous or categorical variables, respectively. In all cases, multiple testing was adjusted by the Bonferroni correction method. Statistical analyses were performed with the R software (v 4.3.1), and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3 Results

All participants with CVD who reported sexual dysfunction in the Cardiology Rehabilitation Program and/or presented with ED were referred to the Andrology Unit. ED was confirmed in 29 cases (CVD + ED) through a clinical routine. The mean age of patients with both pathologies was 63  $\pm$  9 years, with the onset of CVD or ED occurring at 53  $\pm$  12 or 54  $\pm$  18 years old, respectively, as presented in Table 1. In the Cardiology Unit, seven patients with only CVD were included as controls, with a mean age of 50  $\pm$  5 years and a mean age of CVD onset of 51  $\pm$  4 years. In the Andrology Unit, nine patients with ED but without CVD were included as controls, with a mean age of 60  $\pm$  12 years and a mean age of ED onset of 54  $\pm$  12 years.

All participating cases with CVD and ED showed impacted erectile function (IIEF score: 34  $\pm$  15; IIEF-FE score: 11  $\pm$  6) with no impact on mental health (anxiety and depression), and their mean body mass index (BMI) was 24  $\pm$  11 kg/m<sup>2</sup> (18.5–25 kg/m<sup>2</sup>, falling within the normal weight range), as presented in Table 2.

The miRNA-21 expression data of the controls (ED, CVD) and cases (both pathologies) are described in Supplementary Table S1. Significant differences in the miRNA-21 expression levels were obtained among the three groups (ED vs. ED + CVD; CVD vs.

TABLE 1 Socio-demographic and clinical data of the patients in three groups: (1) controls with ED; (2) controls with CVD; and (3) cases with both pathologies.

	Controls with ED	Controls with CVD	Cases with ED + CVD
Patients [% (n)]	20 (9)	16 (7)	64 (29)
Age [years, mean (SD)]	60 (12)*	50 (5)	63 (9)**
Onset age of CVD [years, mean (SD)]	NA	51 (4)	53 (12)
Onset age of ED [years, mean (SD)]	54 (12)	NA	54 (18)

NA, not applicable.

\* $p < 0.05$ .

\*\* $p < 0.005$ .

TABLE 2 Clinical data of the patients in the group of cases with ED and CVD.

	Cases with ED + CVD (n = 29)
IIEF	34 (15)
IIEF-FE	11 (6)
mSLQQ	24 (7)
HADS-depression	3 (4)
HADS-anxiety	5 (5)
BMI	24 (11)

IIEF: 0–57 scores (normal >30); IIEF-FE: 0–30 scores (normal >26); HADS: 0–21 scores; BMI: 18.5–25 kg/m<sup>2</sup> indicates normal weight and <25 kg/m<sup>2</sup> indicates being overweight. Values are presented as mean (SD).

ED + CVD; ED vs. CVD;  $p < 0.001$ ). Linear regression analysis showed an inverse association between miRNA-21 expression levels and ED prevalence ( $p = 0.0368$ ,  $\beta = -2.046$ ).

Also, linear regression analysis revealed significant differences between the ED group and patients with CVD and both pathologies. As depicted in Figure 1 and Supplementary S1, patients with CVD presented significantly lower miRNA-21 expression levels compared to the other two groups ( $p = 0.0368$ ,  $\beta = -2.046$ ), whereas no significant differences were found between the patients with CVD and those with CVD + ED ( $p = 0.5$ ).

Although the numerical correlation was not very high ( $r^2 = -0.21$ ), correlation analyses showed a negative association trend between the relative miRNA-21 expression and the IIEF-FE questionnaire results, with the highest miRNA expression levels observed in those with the highest degree of ED (see Figure 2).

### 4 Discussion and conclusions

The results reported an inverse correlation between miRNA-21 expression and erectile function. One important finding was the significantly elevated serum level of miRNA-21 in ED patients with CVD compared to those with ED alone. This represents an excellent opportunity for conducting general screening in cardiovascular risk patients.

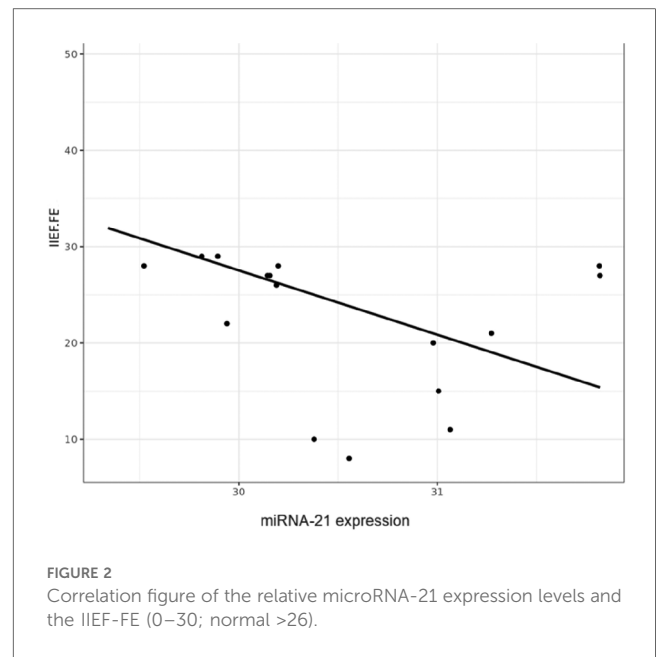
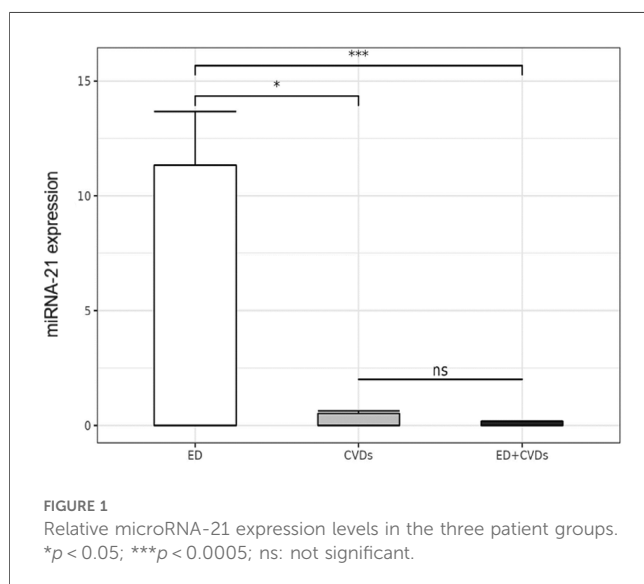


FIGURE 2 Correlation figure of the relative microRNA-21 expression levels and the IIEF-FE (0–30; normal >26).

A recent publication defines the theranoMiRNA term by highlighting the utility of miRNAs in diagnosis and treatment (23). Considering that CVD are the leading cause of death in the world, which is even higher in women (24), the identification of theranoMiRNAs can be essential, and future research should include women among participants. Previous evidence has demonstrated the upregulation of four miRNAs in ED rat penile tissue compared to young rats using microarray analysis (25). Moreover, miRNA-21 could be involved in various cardiomyopathies, as its expression levels undergo significant changes in both cardiac tissue and circulation to offer cardiac protection following heart injury. Our results revealed that miRNA-21 showed significant differences between ED controls and male CVD patients. However, other studies with different populations have demonstrated that individuals with acute heart failure exhibited high plasma miRNA-21 levels from admission to hospital discharge, which subsequently decreased during the clinical compensation period (26). In addition, similar time-dependent fluctuations in circulating miRNA-21 expression have also been observed in patients with post-myocardial infarction (27). Further studies are needed to reveal any potential link between miRNAs and circRNAs or miRNAs (28) correlated with prognosis and predictive value for heart failure (11) in CVD patients across different comorbidities (29, 30) and populations, as well as therapeutic agents in treatment (31, 32), including in female CVD patients. Studies have also investigated the potential use of circulating serum miRNA and fecal miRNA expression as non-invasive markers for early detection (33), which might aid in guiding therapeutics (34). Moreover, in our sample, sexual symptoms should be considered a harbinger for cardiovascular screening, given the opportunity to check ED as a symptom that may help in better managing patients, their comorbidities, therapy, and complications (35, 36). ED, serving as a sentinel marker, could be the first clinical presentation of subclinical endothelial dysfunction disease, affecting even younger men than those in our

sample. Our data support using miRNAs as emerging prognostic markers to further understand the cardiovascular risk in men. Thus, miRNA-21 could be potentially involved in the progression of endothelial damage in male ED patients in the future. This is important because it demonstrates that ED offers physicians a unique opportunity to see the possible future cardiovascular health of their patients and to conduct specific evaluations for CVD.

## 4.1 Limitations

It is well known that observational studies can be affected by several biases. First, the sample size was limited because it was derived from a “convenience sample” from a single center. Dietary habits, lifestyle factors, and limitations in detection methods may influence these findings and their implications for cardiovascular risk. Hence, it is imperative to interpret our results by considering various backgrounds, the multifaceted nature of ED, and the necessity to replicate these results in diverse ethnic populations by including a group of healthy patients without any disease. Furthermore, antihypertensive drug use, depression, and anxiety are the main factors to affect ED. Other sources of error may relate to the complexity of questions or the process required to access the desired information from memory. Only in cases was complete clinical information provided. Future studies will include a complete set of clinical information for both controls and cases.

It is well established that the expression of miRNAs is tightly controlled and is tissue-, developmental stage-, and disease-specific (37). However, we are still unclear about how miRNA-21 expression is regulated in diseased hearts. In future studies, a combination of bioinformatics tools and computational analyses will be needed for the miRNA-21 target gene study.

Briefly, our results strongly support that miRNA expression is higher in ED than in CVD patients associated with erectile function in our study population. Furthermore, future studies need to evaluate the potential use of miRNAs as non-invasive biomarkers to prioritize patients with ED for CVD screening.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The studies involving humans were approved by the Ethics Committee Board of Dr. Balmis General University Hospital of Alicante (Protocol code: PI2022-114). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

## Author contributions

LA: Data curation, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration. AS: Conceptualization, Investigation, Resources, Writing – original draft, Funding Acquisition. SO-M: Formal analysis, Writing – original draft. AB: Data curation, Methodology, Writing – review & editing. RM-P: Investigation, Methodology, Writing – review & editing. VA: Resources, Writing – review & editing. MP: Investigation, Writing – review & editing. PM-M: Formal analysis, Writing – review & editing. TZ: Conceptualization, Supervision, Visualization, Writing – review & editing. AP: Conceptualization, Funding Acquisition, Project administration, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

## Funding

The authors declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

This publication was funded by the Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL).

## Acknowledgments

The authors acknowledge the Department of Health of Dr. Balmis General University Hospital of Alicante, Alicante, Spain, including the Cardiovascular Unit and Andrology Unit nursery support (Guillermina Ferrández) for their assistance in patient care and inclusion. Special gratitude is extended to professional practice students (Irene Goig) and ISABIAL researchers (Jordi Barrachina, Mónica Escorial, Pura Ballester, Beatriz Planelles, María del Mar Inda) for their help in data collection and sample management. We want to particularly acknowledge the patients and the BioBank ISABIAL adhered to the Spanish National Biobanks Network and integrated in the Valencian Biobanking Network for its collaboration. Ana Teresa Brinca acknowledges the PhD fellowships from FCT (2023.03289.BD).

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The handling editor SR declared a shared affiliation with author TZ at the time of review.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product

that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2024.1301925/full#supplementary-material>

## References

- Lou L, Zheng W. Micro RNA 200a contributes to the smooth muscle cells growth in aged-related erectile dysfunction via regulating Rho/ROCK pathway. *Andrologia*. (2022) 54(9):e14503. doi: 10.1111/and.14503
- Rocha B, Rodrigues AR, Tomada I, Martins MJ, Guimarães JT, Gouveia AM, et al. Energy restriction, exercise and atorvastatin treatment improve endothelial dysfunction and inhibit miRNA-155 in the erectile tissue of the aged rat. *Nutr Metab (Lond)*. (2018) 15:28. doi: 10.1186/s12986-018-0265-z
- Thompson IM, Tangen CM, Goodman PJ, Probstfield JL, Moinpour CM, Coltman CA. Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. *JAMA*. (2005) 294:2996–3002. doi: 10.1001/jama.294.23.2996
- Ibrahim A, Ali M, Kiernan TJ, Stack AG. Erectile dysfunction and ischaemic heart disease. *Eur Cardiol Rev*. (2018) 13:98. doi: 10.15420/ocr.2017.21.3
- Imprialos KP, Stavropoulos K, Doumas M, Tziomalos K, Karagiannis A, Athyros VG. Sexual dysfunction, cardiovascular risk and effects of pharmacotherapy. *Curr Vasc Pharmacol*. (2018) 16(2):130–42. doi: 10.2174/157016115666170609101502
- Bai Y, Zhang L, Jiang Y, Ju J, Li G, Xu J, et al. Identification and functional verification of MicroRNAs in the obese rat with erectile dysfunction. *Sex Med*. (2017) 5(4):e261–71. doi: 10.1016/j.sexm.2017.06.006
- Loeb S, Folkvaljon Y, Lambe M, Robinson D, Garmo H, Ingvar C, et al. Use of phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction and risk of malignant melanoma. *JAMA*. (2015) 313(24):2449–55. doi: 10.1001/jama.2015.6604
- Terentes-Prinzios D, Ioakeimidis N, Rokkas K, Vlachopoulos C. Interactions between erectile dysfunction, cardiovascular disease and cardiovascular drugs. *Nat Rev Cardiol*. (2022) 19(1):59–74. doi: 10.1038/s41569-021-00593-6
- Vlachopoulos CV, Terentes-Prinzios DG, Ioakeimidis NK, Aznaouridis KA, Stefanadis CI. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. (2013) 6:99–109. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.112.966903
- Khidr EG, Abulsoud AI, Doghish AA, El-Mahdy HA, Ismail A, Elballal MS, et al. The potential role of miRNAs in the pathogenesis of cardiovascular diseases—a focus on signaling pathways interplay. *Pathol Res Pract*. (2023) 248:154624. doi: 10.1016/j.prp.2023.154624
- Zhang J, Xing Q, Zhou X, Li J, Li Y, Zhang L, et al. Circulating miRNA-21 is a promising biomarker for heart failure. *Mol Med Rep*. (2017) 16(5):7766–74. doi: 10.3892/mmr.2017.7575
- Asjad E, Dobrzynski H. MicroRNAs: midfielders of cardiac health, disease and treatment. *Int J Mol Sci*. (2023) 24(22):16207. doi: 10.3390/ijms242216207
- Sessa F, Salerno M, Esposito M, Cocimano G, Pomara C. miRNA dysregulation in cardiovascular diseases: current opinion and future perspectives. *Int J Mol Sci*. (2023) 24(6):5192. doi: 10.3390/ijms24065192
- Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest*. (2012) 122(11):4190–202. doi: 10.1172/JCI61716
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MdJ, Abeliovich H, Arozena AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. (2016) 12(1):1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356
- Bejerano T, Etzion S, Elyagon S, Etzion Y, Cohen S. Nanoparticle delivery of miRNA-21 mimic to cardiac macrophages improves myocardial remodeling after myocardial infarction. *Nano Lett*. (2018) 18(9):5885–91. doi: 10.1021/acs.nanolett.8b02578
- Rosen RC, Cappelleri JC, Gendrano N 3rd. The International Index of Erectile Function (IIEF): a state-of-the-science review. *Int J Impot Res*. (2002) 14(4):226–44. doi: 10.1038/sj.ijir.3900857
- Edwards D, Hackett G, Collins O, Curram J. Vardenafil improves sexual function and treatment satisfaction in couples affected by erectile dysfunction (ED): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in PDE5 inhibitor-naive men with ED and their partners. *J Sex Med*. (2006) 3(6):1028–36. doi: 10.1111/j.1743-6109.2006.00329.x
- Fisher WA, Rosen RC, Mollen M, Brock G, Karlin G, Pommerville P, et al. Improving the sexual quality of life of couples affected by erectile dysfunction: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of vardenafil. *J Sex Med*. (2005) 2(5):699–708. doi: 10.1111/j.1743-6109.2005.00119.x
- Herrmann C. International experiences with the hospital anxiety and depression scale—a review of validation data and clinical results. *J Psychosom Res*. (1997) 42(1):17–41. doi: 10.1016/S0022-3999(96)00216-4
- Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Health Qual Life Outcomes*. (2003) 1:29. doi: 10.1186/1477-7525-1-29
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$  method. *Methods*. (2001) 25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Sessa F, Salerno M, Esposito M, Cocimano G, Pisanelli D, Malik A, et al. New insight into mechanisms of cardiovascular diseases: an integrative analysis approach to identify theranoMiRNAs. *Int J Mol Sci*. (2023) 24(7):6781. doi: 10.3390/ijms24076781
- Tindall AM, Stallings VA. Sex differences in cardiovascular risk may be related to sex differences in diet patterns: a narrative review. *Ann Hum Biol*. (2021) 48(6):517–24. doi: 10.1080/03014460.2021.1998621
- Song J, Wang J, Liu K, Xu W, Sun T, Liu J. The role of microRNAs in erectile dysfunction: from pathogenesis to therapeutic potential. *Front Endocrinol (Lausanne)*. (2022) 13:1034043. doi: 10.3389/fendo.2022.1034043
- Schneider S, Silvello D, Martinelli NC, Garbin A, Biolo A, Clausell N, et al. Plasma levels of microRNA-21, 126 and -423-5p alter during clinical improvement and are associated with the prognosis of acute heart failure. *Mol Med Rep*. (2018) 17:4736–46. doi: 10.3892/mmr.2018.8428
- Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, Stroud RE, DeSantis SM, Spinale FG. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*. (2011) 4:614–9. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.959841
- Huang J, Ma J, Wang J, Ma K, Zhou K, Huang W, et al. Whole-transcriptome analysis of rat cavernosum and identification of circRNA-miRNA-mRNA networks to investigate nerve injury erectile dysfunction pathogenesis. *Bioengineered*. (2021) 12(1):6516–28. doi: 10.1080/21655979.2021.1973863
- Loureiro D, Tout I, Narguet S, Benazzouz SM, Mansouri A, Asselah T. miRNAs as potential biomarkers for viral hepatitis B and C. *Viruses*. (2020) 12(12):1440. doi: 10.3390/v12121440
- Sekar D, Mani P, Biruntha M, Sivagurunathan P, Karthigeyan M. Dissecting the functional role of microRNA 21 in osteosarcoma. *Cancer Gene Ther*. (2019) 26(7–8):179–82. doi: 10.1038/s41417-019-0092-z
- Alatas ET, Kara M, Dogan G, Akan Belli A. Blood microRNA expressions in patients with mild to moderate psoriasis and the relationship between microRNAs and psoriasis activity. *An Bras Dermatol*. (2020) 95(6):702–7. doi: 10.1016/j.abd.2020.07.001
- Bastaminejad S, Taherikalani M, Ghanbari R, Akbari A, Shabab N, Saidijam M. Investigation of microRNA-21 expression levels in serum and stool as a potential non-invasive biomarker for diagnosis of colorectal cancer. *Iran Biomed J*. (2017) 21(2):106–13. doi: 10.18869/acadpub.ijb.21.2.106
- Hollis M, Nair K, Vyas A, Chaturvedi LS, Gambhir S, Vyas D. MicroRNAs potential utility in colon cancer: early detection, prognosis, and chemosensitivity. *World J Gastroenterol*. (2015) 21(27):8284–92. doi: 10.3748/wjg.v21.i27.8284
- Augustin J, Mandavit M, Outh-Gauer S, Grard O, Gasne C, Lépine C, et al. HPV RNA CISH score identifies two prognostic groups in a p16 positive oropharyngeal

squamous cell carcinoma population. *Mod Pathol.* (2018) 31(11):1645–52. doi: 10.1038/s41379-018-0090-y

35. Foresta C, Ferlin A, Lenzi A, Montorsi P, Italian Study Group on Cardiometabolic Andrology. The great opportunity of the andrological patient: cardiovascular and metabolic risk assessment and prevention. *Andrology.* (2017) 5 (3):408–13. doi: 10.1111/andr.12342
36. Miner M, Parish SJ, Billups KL, Paulos M, Sigman M, Blaha MJ. Erectile dysfunction and subclinical cardiovascular disease. *Sex Med Rev.* (2019) 7 (3):455–63. doi: 10.1016/j.sxmr.2018.01.001
37. Schroen B, Heymans S. MicroRNAs and beyond: the heart reveals its treasures. *Hypertension.* (2009) 54(6):1189–94. doi: 10.1161/HYPERTENSION.AHA.109.133942







## ANEXO II. Artículos Tesis Doctoral en revisión





## **Erectile dysfunction in cardiovascular patients: a prospective study of the eNOS gene T-786C, G894T and INTRON VNTR functional interaction**

**Short Title:** *eNOS gene and ED in cardiovascular patients*

Ana Segura <sup>1</sup>, Javier Muriel <sup>2</sup>, Pau Miró <sup>3</sup>, Laura Agulló <sup>2</sup>, Vicente Arrarte <sup>4</sup>, Patricia Carracedo <sup>5</sup>, Thomas Zandonai <sup>2,6</sup> and Ana M Peiró <sup>2,7</sup> \*

1. Andrology Unit. Urology Department. Dr. Balmis General University Hospital, c/ Pintor Baeza, 12, 03010 Alicante, Spain.
2. Pharmacogenetic Unit, Clinical Pharmacology Department, Dr. Balmis General University Hospital, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), c/ Pintor Baeza, 12, 03010 Alicante, Spain.
3. Dept. of Applied Statistics and Operational Research, and Quality, Universitat Politècnica de València, Campus of Alcoi Plaza Ferrandiz y Carbonell s/n, 03801, Alcoy, Spain.
4. Cardiology Department. Dr. Balmis General University Hospital, c/ Pintor Baeza, 12, 03010 Alicante, Spain.
5. Universidad Internacional de Valencia, Área de empresa, c/Pintor Sorolla, Valencia, 21, 46022, Spain
6. Department of Psychology of Developmental and Socialization Processes, "Sapienza" University of Rome, Via Dei Marsi, 78, 00185, Rome, Italy.
7. Clinical Pharmacology, Toxicology and Chemical Safety Unit, Institute of Bioengineering, Miguel Hernández University, Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain.

e-mail addresses:

Ana Segura: [anasegurap@gmail.com](mailto:anasegurap@gmail.com)

Javier Muriel: [muriel\\_jav@isabial.es](mailto:muriel_jav@isabial.es)

Pau Miró: [pamimar@eio.upv.es](mailto:pamimar@eio.upv.es)

Laura Agulló: [laura.agulloanton@gmail.com](mailto:laura.agulloanton@gmail.com)

Vicente Arrarte: [varrarte@umh.es](mailto:varrarte@umh.es)

Patricia Carracedo: [patricia.carracedo@campusviu.es](mailto:patricia.carracedo@campusviu.es)

Thomas Zandonai: [tzandonai@umh.es](mailto:tzandonai@umh.es)

Ana M. Peiró: [peiro\\_ana@gva.es](mailto:peiro_ana@gva.es)

\* Correspondence: Dr. Ana M Peiró

Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL)

Hospital General Universitario Doctor Balmis,

c/ Pintor Baeza, 12, 03010 Alicante, SPAIN

Tel. no.: +34-96-591-3868. ORCID: 0000-0002-2385-3749

E-mail address: [apeiro@umh.es](mailto:apeiro@umh.es)



## **Abstract**

**Background:** Cardiovascular disease (CVD) induces erectile dysfunction (ED) modulated by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enzyme, and an impaired ejection fraction that restricts penis vascular congestion. However, the mechanisms regulating endothelial dysfunction are not understood.

**Objectives:** Exploring the functional impact of eNOS genetic polymorphisms on ED and drug therapy optimisation in high-risk CVD patients.

**Materials and Methods:** Patients with ED symptoms and candidates for andrology therapy were included (n=112). Clinical data and eNOS rs1799983 (G894T) and rs2070744 (T-786C), genotyped by fluorescence polarization assays, were registered. The 27-bp variable number of the tandem repeat (VNTR) polymorphism in intron 4 (intron4b/a) was analysed by PCR-RFLP. Association analyses were run with the R-3.2.0 software.

**Results:** A significant association between eNOS 786-TT ( $p=0.005$ ) and the aa/ac of intron 4 VNTR ( $p=0.02$ ) with higher ED susceptibility was observed in CVD patients ( $60\pm 9$  years, 66% severe ED, 56% ejection fraction). After 3-months of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors, the ED (IIEF,  $50\pm 16$  scores, the IIEF-EF  $21\pm 10$  scores,  $p<0.001$ ) and sexual quality of life (mSLQQ-QOL  $55\pm 23$  scores,  $p<0.001$ ) had significantly improved. The cardiovascular ejection fraction was influenced positively with better sexual quality of life (0.1941), and also in the eNOS G894-T allele ( $p=0.076$ ) carriers, which could merit future analyses. ED was present as the primary clinical manifestation in 62% of cases, with CVD occurring concurrently. Only former smokers and obese subjects debuted prior to CVD than to ED.

**Conclusions:** Our study provides comprehensive insights into the functional interaction linking eNOS gene polymorphisms, erectile function and ejection fraction in high-risk CVD patients. Future therapeutic strategies could target eNOS activity by including lifestyle changes and epigenetic modulations.

**Keywords:** erectile dysfunction, cardiovascular diseases, eNOS gene, pharmacogenetics

## Introduction

Cardiovascular disease (CVD) has been recognised as the commonest cause of erectile dysfunction (ED), whose importance as a sentinel symptom has grown [1]. Both share a similar endothelial dysfunction pathophysiology related to age [2,3], hypertension, smoking or diabetes [4,5]. Different studies have found that patients with moderate or severe impairments of ejection fraction had significantly increased ED [6,7]. Thus, identification of the biomarkers that could accurately predict particular risk phenotypes may help cardiovascular preventive medicine [8]. Even more because more than one third of ED patients ignore their underlying health problem [9] with potential future cardiovascular consequences.

Nitric oxide (NO) is an important protective molecule in the vasculature, and endothelial NO synthase (eNOS) is responsible for most produced vascular NO [10] that is proposed to regulate coronary blood flow and cardiac performance [11–13]. eNOS has been one of the most studied candidate genes in penile corpus cavernosum smooth muscle pathway relaxation and for mediating vasodilatation [14–17] as the T786C and intron 4 (4b/a) [18]. The individuals carrying the 894-T allele generate low NO in vivo and may be more susceptible to endothelial dysfunction, which might account for higher ED risk [19]. Lower eNOS mRNA and serum nitrite/nitrate levels have been found in individuals homozygous for the C allele of the T786C polymorphism [20]. There is also the 4b/4a VNTR polymorphism in intron 4 which is able to regulate eNOS post-transcriptionally by altering the formation of small interfering RNA (siRNA) and by, consequently, lowering eNOS mRNA levels in five (variant 4b) vs. four (variant 4a) copy [8,21] variants. Thameem et al. [22] showed that the patients carrying 27bp-VNTR exhibited a nominally significant association with cardiovascular measures after adjusting for trait-specific covariate effects. However, the results of most association studies are presently inconsistent [23].

The present study aimed to explore the functional impact of eNOS genetic polymorphisms in high-risk CVD and ED patients. This approach will provide a better understanding of the role of eNOS genetic variants in endothelial dysfunction pathophysiology.

## Materials and Methods

### Study population

A real-world prospective observational study was conducted over a 3.5-year period, from January 2018 to January 2023, except for 18 months (from December 2019 to June 2020) due to the COVID-19 pandemic. Patients were recruited following their routine clinical visits for a Cardiac Rehabilitation Programme (Health Department of the Alicante General Hospital, Spain), which attends to 350 patients per year. In all, 155 patients of 980 patients (15%) were referred to the Andrology Unit. Forty-three subjects (3%) at follow-up were missing, mostly due to not being willing to participate or to continue in the study, or for not meeting the full inclusion criteria for having ED.

At the time of enrolment, all the participants received information on the design and purpose of the study and provided their written informed consent to allow their genetic samples and electronic health records (EHRs) to be used for research purposes. All the methods were carried out in accordance with the ethical guidelines set out in the Declaration of Helsinki. The Research Ethics Committee of the Alicante General Hospital approved the protocol (code: PI2017/03), which complied with applicable STROBE guidelines.

Professional nurses interviewed all those who participated in cardiovascular rehabilitation programmes during a standardised interview using a structured questionnaire that covered socio-demographic characteristics and lifestyle factors (including physical activities, cigarette and alcohol use). Total cigarette consumption (pack-years) was estimated by taking daily consumption, multiplied by consumption years. A health professional also completed a medical details questionnaire. All the patients received a thorough regular medical examination, including medical and drug histories.

Following the questionnaire data collection, the patients who mentioned any sexual disorder were referred to the Andrology Unit for diagnosis and treatment. The referred patients were followed up for a 3-month period upon treatment. Patients' age ranges covered 18-80 years old, and none had been taking hormone medication (supplementation or deprivation) or any phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors before being recruited in the present study. Patients were asked about the sexual disorder that they had experienced prior to CVD onset.

## **Cardiovascular Outcomes**

High-risk CVD individuals were included if they presented myocardial infarction or angina, and had been positively diagnosed with CVD. Individuals were excluded if they had been previously diagnosed with spinal cord or pelvic nerves (e.g. multiple sclerosis, multisystem atrophy, spinal cord injury, tumours), and any conditions that affected the cauda equine, such as prolapsed intervertebral discs or tumours, disease to the parasympathetic nerves within the pelvis, individuals having undergone extensive surgery to the pelvis or abdomen, and conditions like chronic renal failure, hyperprolactinaemia, smooth muscle dysfunction and Peyronie's disease.

## **Erectile Function Outcomes**

The International Index of Erectile Function (IIEF) questionnaire was used to assess male sexual function, particularly the presence or absence of ED. The IIEF consists of 15 items grouped into five sexual function domains: EF, orgasmic function, sexual desire and satisfaction with sexual intercourse and overall satisfaction. Higher scores for this questionnaire correspond to lower degrees of dysfunction. The domain assessing EF (IIEF-EF) includes six questions (maximum score of 30) and is a reliable measure for classifying the degree of ED as severe (1-10), moderate (11-16), mild (17-25) and normal/no dysfunction ( $\geq 26$  scores) [24]. Patients were also asked to complete a questionnaire, the modified Sexual Life Quality Questionnaire (mSLQQ-QOL), on sexual quality of life. The mSLQQ-QOL is a multidimensional tool with which patients and their partners are asked to compare their experiences prior to ED onset to their experiences since treatment began. It presents 10 assessment items: frequency of sex; duration of sex; ease of insertion; ease of achieving orgasm; ease of initiating sex; pleasure of anticipation; carefree feelings during sex; pleasure of orgasm; pleasure overall; partner pleasure [25]. Prescriptions were made as usual for ED management, and included iPDE5 (sildenafil, tadalafil, avanafil or vardenafil).

To measure the impact of mental health, Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) questionnaire scores were used. There are seven items each for the depression and anxiety subscales. Scoring for each item ranges from 0 (no impairment) to 3 (severe impairment). A total subscale score of  $> 8$  points out of a possible 21 denotes considerable anxiety or depression symptoms.



## **eNOS genotyping**

DNA was extracted from 2 ml of saliva collected in phosphate-buffered saline (PBS) buffer-containing tubes. DNA quality control was photometrically verified. The determination of nucleotide changes was made by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique using isolated genomic DNA. Genomic DNA was isolated with the E.N.Z.A. Forensic DNA Kit (Omega bio-tek) according to the manufacturer's instructions. The genotyping of the T786C (rs2070744) and G894T (rs1799983) eNOS polymorphisms was performed by a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific TaqMan probes MGB® (Applied Biosystems). All the PCR amplifications were done in an RT-PCR Rotor Gene Q (Qiagen). The amplification parameters were as follows: 10 min initial denaturation at 95°C, 40 cycles for 15 seconds at 92°C, 90 seconds at 60°C and 1 min final extension at 60°C. For 27-bp intron 4 VNTR eNOS polymorphism genotyping, conventional PCR was performed with 200 ng of DNA. There were three different alleles for this polymorphism: allele "a" of 453 bp, "b" of 480 bp and "c" of 507 bp. The amplification parameters were as follows: 15 min initial denaturation at 96°C, 35 cycles for 30 seconds at 95°C, 20 seconds at 59°C, 45 seconds at 72°C and a 10-minute final extension at 72°C. The primers used for PCR amplification were: forward 5'-TGGAAAGGTAGGGGGACTG-3' and reverse 5'-GGTCACAGGCGTTCCAGTA-3'. PCR products were loaded in 4% agarose gel and visualised under UV light.

## **Statistical Analyses**

Quantitative data are presented as the mean±standard deviation (SD). The Shapiro Wilk test was used to test for normality. The comparisons for the continuous or categorical data between two groups were made by an independent t-test or chi-square test, respectively.

The statistical analysis of the clinical, biochemical and socio-demographical characteristics was performed using the R 3,2,0. The Epi Info™ v.7 software was utilised to compare the distribution of alleles, genotypes and other categorical variables. Fisher exact probability was employed to test for associations. The multiple comparison p-values were corrected by Bonferroni correction. An analysis of haplotypes was carried out by the SNPStats web tool. A probability of null hypothesis lower than 5% was considered significant.

The relative frequencies of genotypes and alleles were calculated for each group. A chi-square analysis was conducted to compare the distribution of genotypes and alleles. As there were only a few

homozygotes per polymorphism, subjects were also grouped as carriers and non-carriers for the analyses; that is, those who tested positive for the presence of allelic variants (dominant model) were defined as participants. The association between IIEF-EF and improved EF upon treatment and the genotyped SNPs were examined by multiple logistic regressions. The associations between ED and CVD (ejective fraction) were examined with multiple logistic regressions. A p value <0.05 was considered statistically significant. Analyses were carried out with the R software package, version 3.2.4.

## **Results**

All the 155 CVD participants who reported decreased libido and/or ED were referred to the Andrology Unit, where ED was confirmed in 112 cases. Thus, a total of 25% (28/112) of the patients were lost to follow-up due withdrawing consent, ED associated with other pathologies, between others. In the end, 84 male Spanish CVD patients with ED finished the prospective study (Fig. 1).

### **Study population**

At the baseline, the CVD patients (n=112, 60±9 years, 100% male Caucasian Spaniards, BMI 29±5 kg/m<sup>2</sup>) presented a normal ejection fraction (56%). The average CVD duration was 7±67 years, and participants were treated mostly with statins (87%), acetylsalicylic acid (85%) and/or beta-blockers (72%). Here 66% showed severe ED and a mean poor sexual quality of life (27+3 scores). The demographic and clinical variables of those included are shown in Table 1.

Middle-aged and elderly male participants were mainly married (77%), followed by divorced (13%) and single or widowed (10%), and had retired (43%), followed by those who presently work (37%). Hypertension and dyslipidaemia were present in 70% of the population. Diabetes, obesity or metabolic syndrome were observed in 31-53%, included 29% former smokers.

### **Temporal relation of ED and CVD**

The data showed that 50% of individuals had experienced ED first, 38% had experienced CVD first, and 12% had noted both conditions at the same age. There were no significant differences in the baseline characteristics, cardiovascular risks and lipid values, except for a significantly higher percentage of former smokers (5% vs. 23%, p=0.002) and obese participants (10% vs. 23%, p=0.062 with a marginal significance) prior to CVD debut than to ED, as Table 2 shows.

As shown in Fig. 2, there was a correlation between the age at first onset of ED and CVD as life span increases. Thus a significant increase in ED and CVD with age was observed. However, the correlation was strong ( $R^2$  0.88) in the group of ED debut first, which is suggested to be a good predictor of CVD. In the other group (CVD debut), the relation correlated less ( $R^2$  0.62) with more variability between onsets. Concomitant ED and CVD accounted for 12%. As this was not part of our objectives (ED as a sentinel symptom), we decided to not include this in Figure 1 in an attempt to reduce variability.

### **Contribution of the eNOS genotypes to ED in CVD patients**

The genotype and allele frequencies for the T786C and G894T polymorphisms agree with the Hardy-Weinberg Equilibrium. Table 3 shows that the frequency of the wild-type form of the T786C and G894T genotypes was 20% and 46%, respectively, with similar Caucasian prevalence. Intron 4 VNTR was studied as previously described, where allele was (a) present in 16%. A comparison between the allele frequency in our study and the data from 1,000 genomes was done by the Mann-Whitney U test.

At the baseline, the patients carrying the eNOS wild-type 786-TT genotype and the aa/ac genotypes of intron 4 VNTR presented significantly worse ED when they were recruited, as shown in Fig. 3 Three months after andrological treatment, the CVD patients reported significant ED improvement, as shown in Table 4. The patients treated with iPDE5 evidenced a significant improvement in EF, with increases of 66% IIEF ( $50 \pm 16$  scores), 47% for IIEF-EF ( $21 \pm 10$  scores,  $p < 0.001$ ) and 50% for sexual quality of life (mSLQQ  $54 \pm 24$  scores,  $p < 0.001$ ). Anxiety and depression levels obtained scores lower than 8, which denote no mental health impairment within the same pre- and post-range andrological treatments. However, a significant scores degree was observed during the final visit. Pharmacological management appears in Table 1S. Here the most used drug were aspirin (86%), statins (86%) and beta-blockers (72%), but with no significant difference between the ED or CVD first groups (see Table 2). We further analysed the interaction of eNOS polymorphisms in relation to the ED response to iPDE 5 management. As seen in Fig. 4, after 3 months of andrological treatment genotypes did not significantly condition a different EF (before and after adjusting for age or BMI) with the IIEF score, and regardless of whether the subject debuted with ED or with CVD. In contrast, a correlation analysis showed that the cardiovascular ejection fraction was not influenced by IIEF (-0.058), IIEF-FE (-0.061) and MSLQQ-QOL (0.194). The G894T polymorphisms had a slight influence ( $p = 0.076$ ) on the distribution of the ejection fraction between genotypes, which could merit future analyses.

## Discussion

The results showed that ED was present as the primary clinical manifestation in 62% of cases, with CVD occurring concurrently, with a greater ED susceptibility in eNOS 786-TT and the aa/ac of intron 4 VNTR genotypes. Our data could merit future analyses, mostly in terms of effective therapeutic management work-up in high-risk CVD individuals.

This finding is consistent with the results reported by other studies in which ED was a potential independent marker for cardiovascular damage [26,27]. Clinicians must assess ED in middle-aged men, especially those who might be at CVD risk. After andrological treatment, our patients indicated significantly improved EF and sexual quality of life with a tendency of improved cardiovascular ejection fraction related to the G894-T polymorphism. This implies that the eNOS genotype and sexual dysfunction pose an excellent opportunity to conduct a general workup during cardiac rehabilitation programmes.

One important objective of cardiac rehabilitation is to restore adequate sexual function and satisfaction. Our evidence shows that there were missed opportunities to undertake a risk assessment and to provide CVD intervention in half the ED cases [28]. ED, as a sentinel marker and an independent marker of CVD [29,30], could be the first clinical presentation of subclinical endothelial dysfunction disease, especially in younger men [31]. This is important because it demonstrates that ED provides physicians with a unique opportunity to see the possible future of their patients' cardiovascular health [27] and to make specific CVD evaluations [32]. According to our data, men with ED should be specifically targeted for CVD prevention strategies both pharmacologically and in terms of lifestyle changes, especially for cigarette smoking and obesity. Indeed nicotine exposure increases the sympathetic nervous system tone by causing vasoconstriction and, thereby, reducing penile blood flow. It also promotes endothelial dysfunction by impairing EF. Hence the sexual function could be incorporated into patients' medical history, taken by the physicians treating individuals with CVD [33], and not merely as part of the diagnostic follow-up, but as a means to pursue tangible and essential benefits in quality of life and cardiovascular outcomes [26] in any cardiovascular risk-screening programme [34]. Furthermore, iPDE5 was found to be an effective, safe and well-tolerated treatment for ED in the present study population, as previously described [35,36].

The association of CVD and ED is greater than expected based on age. A growing body of evidence supports the use of emerging prognostic markers to further understand cardiovascular risk in men with ED, but very few markers have been prospectively evaluated [37]. Our results indicated that the genotypes of eNOS polymorphisms and the intronic variant could be predictive of an elevated risk of ED, suggesting a need for further investigation into their impact on cardiovascular function. Moreover, a significant association of eNOS T-786C ( $p = 0.02$ ) and G894T ( $p=0.005$ ) with altered susceptibility to vasculogenic ED has been previously observed [38] due to the G894T variant ( $p = 0.002$  in a dominant model) and the T-786C variant ( $p = 0.004$  in a recessive model). Consequently, targeting vascular endothelial dysfunction through eNOS gene variants is a promising biomarker because of its potential involvement in CVD progression [39].

In the presence of cardiovascular risk factors, endothelial dysfunction is frequently encountered, and compromises the NO levels synthesised in the endothelium by the eNOS enzyme, which plays a crucial role in not only vascular homeostasis, but also in regulating blood flow and blood pressure [40]. Some reasons like decreased NO synthesis may cause circulating NOS inhibitors levels to rise, which contribute to vascular changes (e.g. higher arterial pressure) in different illnesses [41,42], such as coronary artery disease [43]. In this context, the eNOS G894T and T786C gene variants [20,44] dramatically reduce NO production and transcriptional activity [45,46], which support their functional importance [47] as ED risk pathogenesis factors [45,48,49]. Nowadays, prevailing experimental and clinical data suggest that decreased NO bioavailability accelerates the progression of atherosclerosis, presumably through mechanisms like platelet activation, vascular smooth muscle proliferation, leukocyte adhesion to the endothelium and increased vascular production of reactive oxygen species [50,51]. What is more, the presence of the eNOS 4a4a genotype represents a predisposing condition to cardiovascular events, particularly to acute myocardial infarction [52].

A recent meta-analysis [53,54] has shown a significant association of ED risk and G894T (GT + TT vs. GG: OR = 2.13, 95%CI = 1.08-4.19), T786C (CC vs. CT + TT: OR = 3.29, 95%CI = 2.30-4.72) in Caucasians and Asians (OR = 2.08, 95%CI = 1.53-2.84; OR = 3.13, 95%CI = 1.35-7.25, respectively). In addition, the intron 4 VNTR polymorphism has been associated with ED risk in only Caucasian subjects (aa vs. bb + ab: OR = 2.38, 95%CI = 1.15-4.93). In this context, the eNOS G894T and T786C gene variants [20, 46] dramatically reduce NO production and transcriptional activity [45,46], which supports their functional importance [47] as ED risk pathogenesis factors [45,48,49]. Furthermore,

genetic polymorphisms at other loci, such as replication protein A1 (RPA1) or protein disulphide isomerase (PDI), or in other eNOS complex members, would be necessary [42]. In fact, there is some evidence to suggest that the T-786C allele results in the increased expression of the enzyme and might, consequently, provide a protective mechanism from CVD, which suggests the presence of some essential binding sites for transcription-enhancing proteins [55].

### **Limitations**

It is well-known that observational studies can be affected by several biases. Firstly, sample size was limited by a “convenience sample” from a single centre with a high 25% patients loss. Although this is a prospective study, only one centre participated in this study, which affects the reliability of its conclusion along with the short follow-up of patients. Moreover, geographical location, lifestyle, dietary habits or limitations in detection methods can influence these findings and cardiovascular risk. There are also other comorbidities, such as sleep-disordered breathing (i.e., obstructive sleep apnoea), that share a number of common risk factors and comorbid conditions, including obesity, male gender, advancing age, metabolic syndrome and hypertension [56]. A comprehensive analysis in future studies would be helpful. Therefore, our results should be interpreted after taking into account genetic backgrounds, the multifactorial nature of ED and the fact that the results need to be replicated in other ethnic populations. Besides, antihypertensive drugs, depression and anxiety are the main factors to affect ED [57]. Ejection fraction is not a marker of endothelial dysfunction on its own, but is a marker of a worse prognosis of cardiovascular morbidity and mortality associated with atherosclerotic CVD this type of patients. Therefore, we believe that knowing this relation for our study is relevant. Finally, considering that bias may have a major impact on the validity and reliability of the research findings, the following actions were taken to minimise it: 1/ standardised protocols and validated questionnaires help to ensure that observations were made consistently and objectively; 2/ blinding pharmacogenetic information to clinicians. All this ensures that observer expectations and preconceptions do not impact their observations or interpretations of facts; 3/ prospective design.

In conclusion, this study found that eNOS polymorphisms are associated with an increased risk of developing ED and more CVD male patients. ED could also improve the identification of suitable CVD patients for screening, and would lead to early detection and to enhance therapeutic management.

Large-scale prospective studies, including concurrent assessments of serum NO levels, could be done to fully understand the effects of eNOS polymorphism on susceptibility to CVD.



**Supplementary Materials: Table 1S.** Pharmacological management of the sample population

**Author Contributions:** Conceptualization, A.S. and A.P.; methodology, A.P. and J.M.; software, P.M.; formal analysis, J.M. and P.M.; investigation, L.A., V.A, A.P.; resources, A.S. and A.P.; data curation, A.S., J.M. and P.M.; writing—original draft preparation, A.S., J.M. and A.P.; writing—review and editing, T.Z. and A.P.; visualization, J.M., T.Z. and A.P.; supervision, T.Z. and A.P.; project administration, A.P.; funding acquisition, A.S., T.Z. and A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee Board of the Dr. Balmis General University Hospital of Alicante (code: PI2017-34).

**Informed Consent Statement:** it was obtained from all the subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patients to publish this paper.

**Acknowledgments:** We thank the Department of Health of the Alicante General Hospital, Alicante, Spain; the Cardiovascular Unit and Andrology nursery support (Guillermina Ferrández) for their help with patient care and support upon inclusion. Special thanks go to the professional practice students (Diego Orts, Rafael Sellers, Samuel Murillo, and Irene Goig), former predoctoral researchers (Mónica Escorial, Pura Ballester, Beatriz Planelles), ISABIAL researchers (Jordi Barrachina, María del Mar Inda) and Erasmus+ researchers (Ana Teresa Brinca) for their help in data collection and sample management.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. Funders played no role in the study design; in the data collection, analyses or interpretation; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.



## **References**

- [1] Yannas D, Frizza F, Vignozzi L, et al. Erectile Dysfunction Is a Hallmark of Cardiovascular Disease: Unavoidable Matter of Fact or Opportunity to Improve Men's Health? *J Clin Med* 2021;10.
- [2] Miner MM, Kuritzky L. Erectile dysfunction: a sentinel marker for cardiovascular disease in primary care. *Cleve Clin J Med* 2007;74 Suppl 3.
- [3] Osta P, Grivel T, Giuliano F, et al. Erectile dysfunction: a sentinel symptom? *Prog En Urol* 2005;15:203–7.
- [4] Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, et al. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol* 2000;163:460–3.
- [5] Ruiz-García A, Arranz-Martínez E, Cabrera-Vélez R, et al. Prevalence of erectile dysfunction in Spanish primary care setting and its association with cardiovascular risk factors and cardiovascular diseases. SIMETAP-ED study. *Clin Investig Arterioscler* 2019;31:101–10.
- [6] Baumhäkel M, Böhm M. Erectile dysfunction correlates with left ventricular function and precedes cardiovascular events in cardiovascular high-risk patients. *Int J Clin Pract* 2007;61:361–6.
- [7] Carella MC, Forleo C, Stanca A, et al. Heart Failure and Erectile Dysfunction: a Review of the Current Evidence and Clinical Implications. *Curr Heart Fail Rep* 2023.
- [8] Cozma A, Fodor A, Orasan OH, et al. Pharmacogenetic Implications of eNOS Polymorphisms ( Glu298Asp, T786C, 4b/4a) in Cardiovascular Drug Therapy. *In Vivo* 2019;33:1051–8.
- [9] Gombert M, Ballester P, Segura A, et al. Introducing sexual dysfunction in mental care. *Expert Opin Drug Saf* 2021;20:69–79.
- [10] Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113:1708–14.
- [11] Cortese-Krott MM, Suvorava T, Leo F, et al. Red blood cell eNOS is cardioprotective in acute myocardial infarction. *Redox Biol* 2022;54.
- [12] Tran N, Garcia T, Aniq M, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States. *Am J Biomed Sci Res* 2022;15:153–77.
- [13] Mandras SA, Uber PA, Mehra MR. Sexual activity and chronic heart failure. *Mayo Clin Proc* 2007;82:1203–10.
- [14] Lopushnyan NA, Chitale K. Genetics of erectile dysfunction. *J Urol* 2012;188:1676–83.
- [15] Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2832–5.
- [16] Erol B, Bozdogan G, Akduman B, 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;6:1423–9.
- [17] Jíra M, Závodná E, Honzíkova N, et al. Association of eNOS gene polymorphisms T-786C and G894T with blood pressure variability in man. *Physiol Res* 2011;60:193–7.
- [18] Colomba D, Duro G, Corrao S, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular damage in hypertensive subjects: an Italian case-control study. *Immun Ageing* 2008;5.

- [19] Hermans MP, Ahn SA, Rousseau MF. eNOS [Glu298Asp] polymorphism, erectile function and ocular pressure in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2012;42:729–37.
- [20] Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999;99:2864–70.
- [21] Cooke GE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. *Pharmacogenomics* 2007;8:1723–34.
- [22] Thameem F, Puppala S, Arar NH, et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes-related traits in Mexican Americans. *Diabetes Vasc Dis Res* 2008;5:109–13.
- [23] Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2006;48:700–10.
- [24] Rosen RC, Cappelleri JC, Gendrano N. The International Index of Erectile Function (IIEF): a state-of-the-science review. *Int J Impot Res* 2002;14:226–44.
- [25] Fisher WA, Rosen RC, Mollen M, et al. Improving the sexual quality of life of couples affected by erectile dysfunction: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of vardenafil. *J Sex Med* 2005;2:699–708.
- [26] Miner M, Parish SJ, Billups KL, et al. Erectile Dysfunction and Subclinical Cardiovascular Disease. *Sex Med Rev* 2019;7:455–63.
- [27] Randrup E, Baum N, Feibus A. Erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Postgrad Med* 2015;127:166–72.
- [28] Angelis A, Chrysohoou C, Tzorovili E, et al. The Mediterranean Diet Benefit on Cardiovascular Hemodynamics and Erectile Function in Chronic Heart Failure Male Patients by Decoding Central and Peripheral Vessel Rheology. *Nutrients* 2020;13:1–11.
- [29] Nehra A, Jackson G, Miner M, et al. Diagnosis and treatment of erectile dysfunction for reduction of cardiovascular risk. *J Urol* 2013;189:2031–8.
- [30] Terentes-Printzios D, Ioakeimidis N, Rokkas K, et al. Interactions between erectile dysfunction, cardiovascular disease and cardiovascular drugs. *Nat Rev Cardiol* 2022;19:59–74.
- [31] Jackson G, Nehra A, Miner M, et al. The assessment of vascular risk in men with erectile dysfunction: the role of the cardiologist and general physician. *Int J Clin Pract* 2013;67:1163–72.
- [32] Mostafaei H, Mori K, Hajebrahimi S, et al. Association of erectile dysfunction and cardiovascular disease: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *BJU Int* 2021;128:3–11.
- [33] Lojanapiwat B, Weerusawin T, Kuanprasert S. Erectile dysfunction as a sentinel marker of endothelial dysfunction disease. *Singapore Med J* 2009;50:698–701.
- [34] Jackson G. Erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Arab J Urol* 2013;11:212–6.
- [35] Buranakitjaroen P, Mangklabruks A, Leungwattanakij S, et al. Efficacy and safety of sildenafil in Asian males with erectile dysfunction and cardiovascular risk. *J Med Assoc Thai* 2007;90:1100–8.
- [36] Olsson AM, Persson CA, Swedish Sildenafil Investigators Group. Efficacy and safety of sildenafil citrate for the treatment of erectile dysfunction in men with cardiovascular disease. *Int J Clin Pract* 2001;55:171–6.
- [37] Miner M, Nehra A, Jackson G, et al. All men with vasculogenic erectile dysfunction require a cardiovascular workup. *Am J Med* 2014;127:174–82.
- [38] Ben Khedher MR, Abid M, Jamoussi K, et al. Comprehensive insight into functional

- interaction between GNB3 C825T and eNOS T-786C, G894T gene polymorphisms and association with susceptibility to diabetic erectile dysfunction. *Andrology* 2018;6:865–73.
- [39] Daiber A, Xia N, Steven S, et al. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci* 2019;20.
- [40] Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:190–3.
- [41] Hsu C-N, Huang L-T, Lau Y-T, et al. The combined ratios of L-arginine and asymmetric and symmetric dimethylarginine as biomarkers in spontaneously hypertensive rats. *Transl Res J Lab Clin Med* 2012;159:90–8.
- [42] Gu Z, Zhang Y, Qiu G. Promoter polymorphism T-786C, 894G→T at exon 7 of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with risk of osteoporosis in Sichuan region male residents. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:15270–4.
- [43] Sung JH, Lee BE, Kim JO, et al. Association between eNOS polymorphisms and risk of coronary artery disease in a Korean population: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2015;14:16508–20.
- [44] Seckin Y, Yigit A, Yesilada E, et al. Association of eNOS Gene Polymorphisms G894T and T-786C with Risk of Hepatorenal Syndrome. *Gastroenterol Res Pract* 2016;2016.
- [45] Lee YC, Huang SP, Liu CC, et al. The association of eNOS G894T polymorphism with metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J Sex Med* 2012;9:837–43.
- [46] Gao L, Zhao Z, Guo F, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms with an increased risk of erectile dysfunction. *Asian J Androl* 2017;19:330–7.
- [47] Marsot-Dupuch K, Tubiana JM, de Malmont-Homualk C. Lymphomatoid granulomatosis. Value of standard radiography. Apropos of a case. *J Radiol* 1983;64:639–42.
- [48] Erkan E, Muslumanoglu AY, Oktar T, et al. Polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in patients with erectile dysfunction. *J Sex Med* 2006;3:69–76.
- [49] Sinici I, Güven EO, Şerefoğlu E, et al. T-786C polymorphism in promoter of eNOS gene as genetic risk factor in patients with erectile dysfunction in Turkish population. *Urology* 2010;75:955–60.
- [50] Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;43:562–71.
- [51] Skovgaard N, Galli G, Abe A, et al. The role of nitric oxide in regulation of the cardiovascular system in reptiles. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;142:205–14.
- [52] Fatini C, Sofi F, Sticchi E, et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004;147:516–21.
- [53] Dai F, Zhu L, Mi Y, et al. An Updated Meta-Analysis of the Effects of the Endothelial Nitric Oxide synthase Gene G894T Polymorphism and Erectile Dysfunction Risk. *Cell Biochem Biophys* 2015;72:821–8.
- [54] Yao HX, Ma FZ, Tan YY, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of erectile dysfunction: An updated meta-analysis of genetic association studies. *Int J Surg* 2018;54:141–8.
- [55] Elakkad AM, Abou-Aisha K, Hassanein SI, et al. T-786C variation in the promoter sequence of human eNOS gene markedly influences its expression level. *Drug Discov*

Ther 2017;11:193–7.

- [56] Collen J, Lettieri C, Wickwire E, et al. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease, a story of confounders! *Sleep Breath* 2020;24:1299–313.
- [57] Dai H, Wang J, Zhao Q, et al. Erectile dysfunction and associated risk factors in male patients with ischemic stroke: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)* 2020;99.



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Flow chart of study inclusion presenting the subjects recruitment for a 3.5-year inclusion period. Patients were referred from the Cardiovascular Rehabilitation Programme to the Andrology Unit (n=155) for erectile dysfunction (ED) screening and management.

**Figure 2.** Correlation of age (years-old) upon onset of erectile dysfunction (ED) and cardiovascular disease, using real-world observational data in the Andrology Unit (n=112).

**Figure 3.** The International Index of Erectile Function (IIEF) questionnaire values during the Andrology Unit baseline visit due to the T-786C ( $p>0.001$ ) and intron VNTR4 eNOS ( $p<0.001$ ) genotypes.

**Figure 4.** Functional impact of eNOS genetic polymorphisms on erectile dysfunction (ED) and drug therapy optimisation in high-risk CVD patients through the International Index of Erectile Function (IIEF-EF) questionnaire during the basal and final visits to the Andrology Unit.



**Table 1.** Socio-demographic and biochemical characteristics of the total population (n=112 men) with erectile dysfunction and cardiovascular disease during the baseline visit to the Andrology Unit.

<b>Basal variables</b>	<b>Mean ± SD</b>
<b>Age (years)</b>	60 ± 9
<b>IIEF-EF severe (&lt; 10 score; %)</b>	66
<b>Cardiovascular Ejection fraction (%)</b>	56
<b>Age upon first episode (years)</b>	
Erectile dysfunction	56 ± 10
Cardiovascular disease	54 ± 10
<b>Laboratory test (mg/dL)</b>	
Total cholesterol	136 ± 36
HDL cholesterol	42 ± 12
Triglycerides ±	142 ± 77
Creatinine	1.8 ± 6.2
<b>Vascular Risk Factors (%)</b>	
Hypertension	70
Dyslipidaemia	70
Diabetes mellitus	53
Former smoker	29
Obesity	34
Metabolic syndrome	31

**Table 2.** Descriptive data when comparing patients debuting with erectile dysfunction (ED) and/or cardiovascular disease (CVD) upon inclusion. Significant differences ( $p < 0.05$ ) are depicted in bold.

<b>Variable, mean (SD) at baseline</b>	<b>ED first (n=56)</b>	<b>CVD first (n=42)</b>	<b>p-value</b>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28 ± 4	29 ± 5	0.146
<b>Ejection fraction (%)</b>	54	58	0.107
<b>Laboratory test (mg/dL)</b>			
Total cholesterol	142 ± 45	131 ± 27	0.300
HDL cholesterol	42 ± 10	43 ± 13	0.810
Triglycerides	144 ± 70	141 ± 8	0.456
Creatinine	2.5 ± 9.4	1.2 ± 1.1	0.563
<b>Vascular Risk Factors (%)</b>			
Hypertension	29	41	0.799
Diabetes mellitus	23	30	0.829
Dyslipidaemia	30	39	0.756
Former smoker	5	23	<b>0.002*</b>
Obesity	10	23	<b>0.062</b>
Metabolic syndrome	12	19	0.303
<b>Clinical outcomes</b>			
IIEF (5-75 scores)	32 ± 12	34 ± 13	0.680
IIEF-EF (1-30 scores)	9 ± 5	10 ± 6	0.254
mSLQQ-QOL (0-100 scores)	27 ± 11	27 ± 27	0.663
HADA scale (0-21 scores)	6 ± 5	6 ± 4	0.907
HADD scale (0-21 scores)	4 ± 5	4 ± 4	0.690
<b>Pharmacology management (%)</b>			
ACE inhibitors	30	35	0.7752
Aldosterone	4	5	0.9999
Alpha blocker 1	2	11	0.1629
Antidepressants	2	11	0.1629
Antithrombotic agents	13	10	0.7872

ARA-II	33	38	0.6981
Acetylsalicylic acid	89	84	0.6402
Beta-blockers	67	76	0.4244
Calcium channel blockers	22	24	0.9814
Diuretics	11	29	0.0456
Ezethimide	35	22	0.2176
Hypoglycaemic agents	41	40	0.9999
Insuline	15	17	0.9599
iPDE5	80	71	0.3947
Statins	83	89	0.5102
Thienopyridines	24	32	0.4963

BMI: body mass index; HDL: high-density lipoprotein; IIEF-EF: Index of Erectile Function questionnaire (erectile function); the modified Sexual Life Quality Questionnaire (mSLQQ-QOL); Hospital Anxiety and Depression Scale (HAD) as Anxiety (HADA) or Depression (HADD), ACE inhibitors: angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARA-II: angiotensin II receptor antagonists; phosphodiesterase type 5 (iPDE5) inhibitors.





**Table 3.** Allelic frequencies of the T786C, G894T genotypes and intron 4VNTR of the eNOS gene when comparing our study frequency to other populations. Results of 106 genotyped patients.

Polymorphism	Genotype, n (%)			Wild-type frequency	
				Study (n=112)	Population (n=1,006)
<b>T786C (rs2070744)</b>	21 (20) (TT)	57 (54) (CT)	28 (26) (CC)	47% (T)	56% (T)
<b>G894T (rs1799983)</b>	47 (46) (GG)	53 (51) (GT)	3 (3) (TT)	71% (G)	66% (G)
<b>Intron 4VNTR</b>	17 (16) (aa/ac)	89 (84) (bb/bc)	-	9% (a)	2% (a)



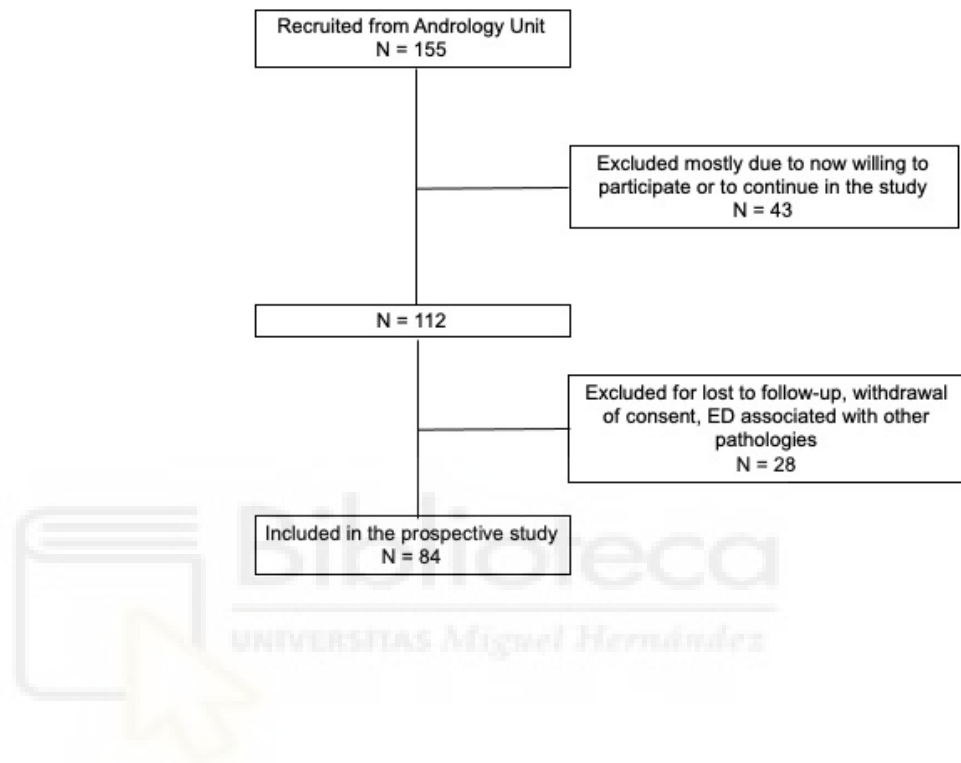
**Table 4.** Clinical characteristics of the total population during the basal visit (n=112) and 3 months after the final visit (n=84) after Andrology management. Significant differences (p<0.05) are depicted in bold.

Variable	Basal (n=112)	End (n=84)	p-value
IIEF (5-75 scores), basal visit	33 ± 13	50 ± 16	<b>&lt;0.001</b>
IIEF-EF (1-30 scores), basal visit	10 ± 6	21 ± 10	<b>&lt;0.001</b>
mSLQQ-QOL (0-100 scores), basal visit	27 ± 13	54 ± 24	<b>&lt;0.001</b>
Anxiety (HAD scale, 0-21 scores, mean ± SD)	5 (2-8)	4 (2-9)	<b>0.043</b>
Depression (HAD scale, 0-21 scores, median (RIQ))	3 (1-6)	2 (0-6.5)	<b>0.043</b>

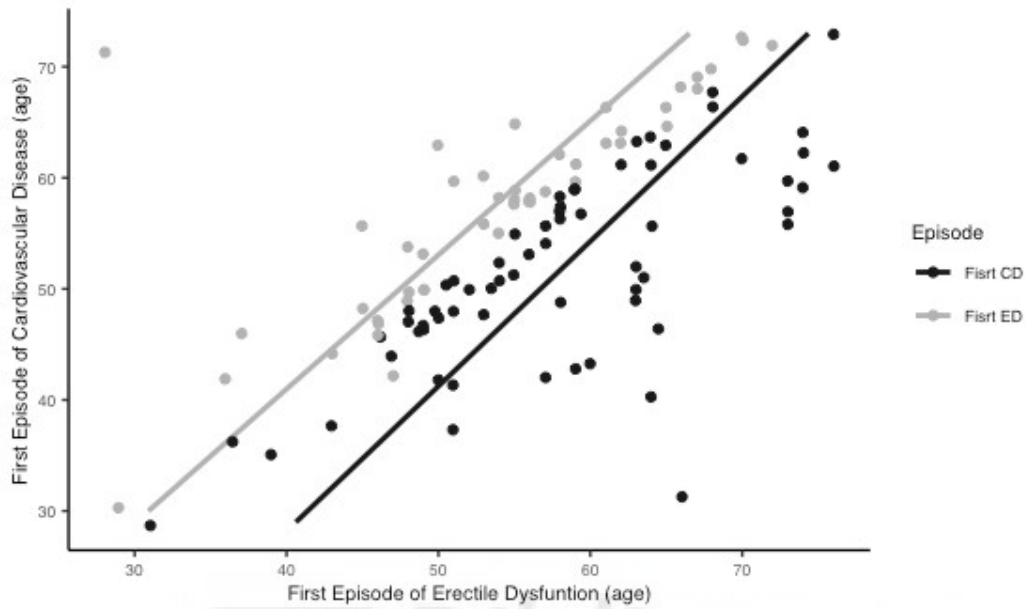
IIEF-EF: Index of Erectile Function questionnaire (erectile function); the modified Sexual Life Quality Questionnaire (mSLQQ-QOL); Hospital Anxiety and Depression Scale (HAD) as Anxiety (HADA) or Depression (HADD)



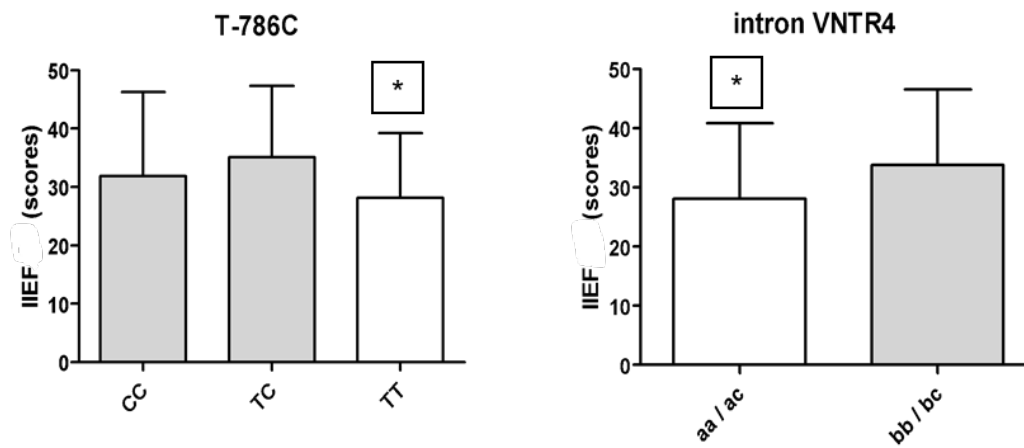
**Figure 1.** Flow chart of study inclusion presenting the subjects recruitment along three and a half period of inclusion. Patients were derived from Cardiovascular Rehabilitation Program to Andrology Unit (n=155) for erectile dysfunction (ED) screening and management.



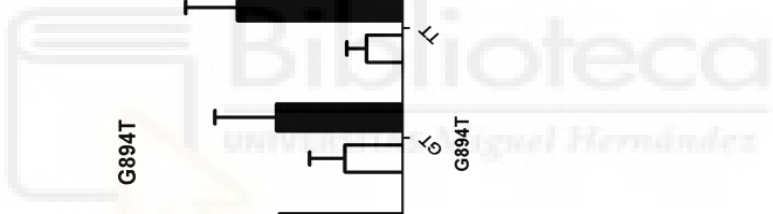
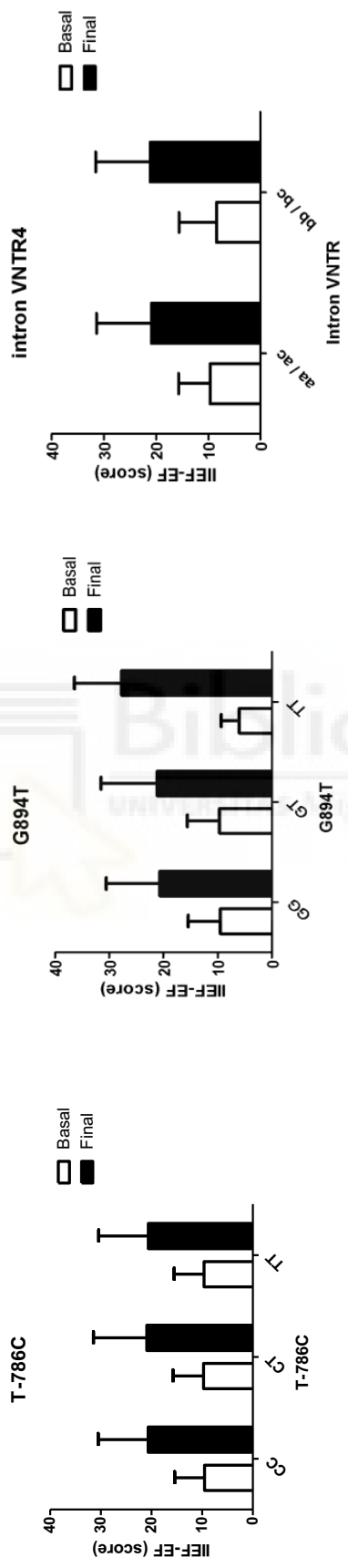
**Figure 2.** Correlation figure of age (years) upon onset of erectile dysfunction (ED first) and cardiovascular disease (CVD first) using real-world observational data at Andrology Unit (n=112).



**Figure 3.** The International Index of Erectile Function (IIEF-EF) questionnaire values at the Andrology Unit baseline visit due to the T-786C ( $p>0.001$ ) and intron VNTR4 eNOS ( $p<0.001$ ) genotypes.



**Figure 4.** Functional impact of eNOS genetic polymorphisms on erectile dysfunction and drug therapy optimisation in high-risk CVD patients through the International Index of Erectile Function (IIEF-EF) questionnaire, at basal and final visits in the Andrology Unit.



**Table 1S.** Pharmacological management of the sample population

<b>Pharmacological treatment</b> n (%)	<b>Total population</b> (n=112)
<b>Andrological management</b>	
Phosphodiesterase 5 inhibitors	85 (76)
Virirec	9 (8)
Muse	5 (4)
Intracavernous injection	1 (1)
<b>Cardiovascular drugs</b>	
B-blockers	81 (72)
Angiotensin converting enzyme inhibitors	36 (32)
Angiotensin II receptor antagonists	41 (37)
Calcium channel blockers	26 (23)
Acetylsalicylic acid	95 (85)
Aldosterone antagonist	5 (4)
Diuretic	23 (21)
Anti a1	9 (8)
Anticoagulant	14 (13)
Oral antidiabetic	46 (42)
Insulin	19 (17)
Statins	97 (87)
Nitrates	1 (1)
Ezetimide	32 (29)
Thienopyridine	31 (28)
<b>Other drugs</b>	
Antidepressant	8 (7)
Antipsychotic	1 (1)
Opioids	19 (17)





## ANEXO III – Aprobación Comités Ética





## INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

Reunidos los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, en su sesión del día 24 de Abril de 2013, y una vez estudiada la documentación presentada por la **Dra. Ana M<sup>a</sup> Peiró Peiró**, Médico Adjunto de la Sección de Farmacología Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado **"Estudio paralelo de factores predictivos genéticos asociado al estudio de la disfunción eréctil en pacientes con dolor no oncológico con tratamiento crónico de opioides"**, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Y para que conste, lo firma en Alicante con fecha veinticuatro de Abril de dos mil trece.

  
Fdo. Elena López Navarro  
Secretaria del CEIC





(Ref. CEIC PI2017/34)

## INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

Reunidos los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, en su sesión del día 31 de Mayo de 2017, y una vez estudiada la documentación presentada por la **Dra. Ana Segura Paños**, Médico Adjunto del Servicio de Urología (Andrología) del Hospital General Universitario de Alicante, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado **"Implicación de las variantes del gen eNOS en el riesgo cardiovascular de los pacientes con disfunción eréctil"**, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Alicante con fecha veintisiete de Junio de dos mil diecisiete.

  
  
Fdo. Mayte Domenech Varón  
Secretaria del CEIC



**COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL  
DEPARTAMENTO DE SALUD DE ALICANTE - HOSPITAL GENERAL**

C/. Pintor Baeza, 12 – 03010 Alicante  
<http://www.dep19.san.gva.es>  
Teléfono: 965-913-921  
Correo electrónico: ceim\_hgua@gva.es

Ref. CEIm: PI2022 - 114 Ref. ISABIAL: 2022-0397

**INFORME DEL COMITE DE ETICA PARA LA INVESTIGACION CON  
MEDICAMENTOS**

Reunidos los miembros del Comité de Ética para la Investigación con medicamentos del Departamento de Salud de Alicante – Hospital General, en su sesión del día 28 de septiembre de 2022 (Acta 2022-08), y una vez estudiada la documentación presentada por **Dña. Laura Agulló Antón** de ISABIAL, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado **"Implicación miRNA en el riesgo cardiovascular de los pacientes con disfunción eréctil"**, se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos. Se informa a su vez de que este estudio ha solicitado la exención del Consentimiento Informado.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Alicante con fecha 18 de octubre de 2022.

Fdo. Dr. Luis Manuel Hernández Blasco  
Secretario Técnico CEIm Departamento de  
Salud de Alicante – Hospital General





## ANEXO IV – Cuestionarios utilizados





# INDICE INTERNACIONAL DE FUNCION ERECTIL - IIEF -

Iniciales del paciente \_\_\_\_\_ Nº identificación \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

¿Es usted sexualmente activo (definitivo como actividad sexual con pareja o estimulación manual)?

**SI**

**NO**

En caso afirmativo, por favor cumplimente el cuestionario relativo a su actividad sexual. (en cada pregunta, marque sólo una casilla).

	SIN ACTIVIDAD SEXUAL	CASI NUNCA ó NUNCA	MENOS DE LA MITAD DE LAS VECES	LA MITAD DE LAS VECES	MAS DE LA MITAD DE LAS VECES	CASI SIEMPRE ó SIEMPRE
1. Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia logró una erección durante la actividad sexual <sup>B</sup> ?	0	1	2	3	4	5
2. Durante las últimas 4 semanas, cuando tuvo erecciones con la estimulación sexual <sup>D</sup> , ¿con qué frecuencia fue suficiente la rigidez para la penetración?	0	1	2	3	4	5
3. Durante las últimas 4 semanas, al intentar una relación sexual <sup>A</sup> , ¿con qué frecuencia logró penetrar a su pareja?	0	1	2	3	4	5
4. Durante las últimas 4 semanas, durante la relación sexual <sup>A</sup> , ¿con qué frecuencia logró mantener la erección después de la penetración?	0	1	2	3	4	5

	SIN ACTIVIDAD SEXUAL	EXTREMADAMENTE DIFICIL	MUY DIFICIL	DIFICIL	ALGO DIFICIL	SIN DIFICULTAD
5. Durante las últimas 4 semanas, durante la relación sexual <sup>A</sup> , ¿Cuál fue el grado de dificultad para mantener la erección hasta completar la relación sexual?	0	1	2	3	4	5

	NINGUNA	1-2 VECES	3-4 VECES	5-6 VECES	7-10 VECES	11 ó MAS
6. Durante las últimas 4 semanas, ¿cuántas veces intentó una relación sexual <sup>A</sup> ?	0	1	2	3	4	5

	SIN ACTIVIDAD SEXUAL	CASI NUNCA ó NUNCA	MENOS DE LA MITAD DE LAS VECES	LA MITAD DE LAS VECES	MAS DE LA MITAD DE LAS VECES	CASI SIEMPRE ó SIEMPRE
7. Durante las últimas 4 semanas, cuando intentó una relación sexual <sup>A</sup> , ¿con qué frecuencia resultó satisfactoria para usted?	0	1	2	3	4	5

**A = Acto sexual;**

Se define como la penetración de la pareja.

**B = Actividad sexual;**

Incluye el acto sexual, caricias juegos anteriores al acto y la masturbación.

**C = Eyacular;**

Se define como la expulsión de semen del pene (o la sensación de hacerlo).

**D = Estimulación sexual;**

Incluye situaciones como juegos amorosos con una pareja o mirar fotos eróticas, etc.

## INDICE INTERNACIONAL DE FUNCION ERECTIL - IIEF - (cont.)

	NO REALICE EL ACTO	NO DISFRUTE NADA	NO DISFRUTE MUCHO	DISFRUTE ALGO	DISFRUTE BASTANTE	DISFRUTE MUCHO
8. Durante las últimas 4 semanas, ¿cuánto ha disfrutado de la relación sexual <sup>A</sup> ?	0	1	2	3	4	5

	SIN ACTIVIDAD SEXUAL	CASI NUNCA ó NUNCA	MENOS DE LA MITAD DE LAS VECES	LA MITAD DE LAS VECES	MAS DE LA MITAD DE LAS VECES	CASI SIEMPRE ó SIEMPRE
9. Durante las últimas 4 semanas, durante la estimulación o la relación sexual <sup>A</sup> , ¿con qué frecuencia eyaculó <sup>C</sup> ?	0	1	2	3	4	5
10. Durante las últimas 4 semanas, durante la estimulación <sup>C</sup> o la relación sexual <sup>A</sup> , ¿con qué frecuencia tuvo una sensación de orgasmo <sup>C</sup> (con o sin eyaculación)?	0	1	2	3	4	5

Las siguientes dos preguntas se refieren al deseo sexual, definido como una sensación que puede ser un deseo de tener una experiencia sexual (por ejemplo, masturbación o relación sexual), un pensamiento sobre una relación sexual o un sentimiento de frustración por no tener una relación sexual.

	CASI NUNCA ó NUNCA	EN ALGUNOS MOMENTOS	BUENA PARTE DEL TIEMPO	LA MAYOR PARTE DEL TIEMPO	CASI SIEMPRE ó SIEMPRE
11. Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia ha sentido un deseo sexual?	1	2	3	4	5

	MUY BAJO ó NULO	BAJO	MODERADO	ALTO	MUY ALTO
12. Durante las últimas 4 semanas, ¿cómo calificaría su nivel de deseo sexual?	1	2	3	4	5

	MUY INSATISFECHO	BASTANTE INSATISFECHO	NI SATISFECHO NI INSATISFECHO	BASTANTE SATISFECHO	MUY SATISFECHO
13. Durante las últimas 4 semanas, ¿cuál ha sido el grado de satisfacción con su vida sexual en general?	1	2	3	4	5
14. Durante las últimas 4 semanas, ¿cuál ha sido el grado de satisfacción con la relación sexual con su pareja?	1	2	3	4	5

	MUY BAJO ó NULO	BAJO	MODERADO	ALTO	MUY ALTO
15. Durante las últimas 4 semanas, ¿cómo calificaría la confianza que tiene en poder lograr y mantener una erección?	1	2	3	4	5

**A = Acto sexual;**

Se define como la penetración de la pareja.

**B = Actividad sexual;**

Incluye el acto sexual, caricias juegos anteriores al acto y la masturbación.

**C = Eyacular;**

Se define como la expulsión de semen del pene (o la sensación de hacerlo).

**D = Estimulación sexual;**

Incluye situaciones como juegos amorosos con una pareja o mirar fotos eróticas, etc.

## 2.2. CUESTIONARIO DE LA CALIDAD DE VIDA SEXUAL (mSLQQ)

FECHA DE CUMPLIMENTACIÓN \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

En las siguientes preguntas usted debe comparar su vida sexual general y sus relaciones sexuales (tanto la estimulación erótica previa, como el coito) DE LAS ÚLTIMAS SEMANAS con el período ANTERIOR A LA APARICIÓN DE LA IMPOTENCIA. Por favor, señale con un círculo en cada escala el número (entre -4 y +4) que refleje su mejor calificación.

1) ¿Cómo valoraría su satisfacción con la FRECUENCIA CON LA QUE HACE EL AMOR durante las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
Mucho menos satisfecho con la frecuencia de estimulación previa/coito que antes de la impotencia				Igual				Mucho más satisfecho con la frecuencia de estimulación previa/coito que antes de la impotencia

2) ¿Cómo valoraría su satisfacción con la DURACIÓN DE LAS RELACIONES SEXUALES que ha tenido durante las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
Mucho menos satisfecho con la duración de estimulación previa/coito que antes de la impotencia				Igual				Mucho más satisfecho con la duración de estimulación previa/coito que antes de la impotencia

3) ¿Cómo valoraría la dificultad para INTRODUCIR EL PENE EN LA VAGINA durante las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
Mucho más difícil introducir el pene en la vagina que antes de la impotencia				Igual				Mucho más fácil introducir el pene en la vagina que antes de la impotencia

4) ¿Cómo valoraría la dificultad para LLEGAR AL ORGASMO durante las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
Mucho más difícil llegar al orgasmo que antes de la impotencia				Igual				Mucho más fácil llegar al orgasmo que antes de la impotencia

5) ¿Cómo valoraría su PREOCUPACIÓN POR EL RENDIMIENTO SEXUAL de las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
Me preocupo mucho más por mi rendimiento sexual que antes de la impotencia				Igual				Me preocupo mucho menos por mi rendimiento sexual que antes de la impotencia

6) ¿Cómo valoraría lo que siente al PENSAR EN MANTENER RELACIONES SEXUALES en las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
Pensar en la estimulación erótica previa/coito me resulta muchos menos agradable que antes de la impotencia				Igual	Pensar en la estimulación erótica previa/coito me resulta muchos más agradable que antes de la impotencia			

7) ¿Cómo valoraría los SENTIMIENTOS QUE HA TENIDO DURANTE EL ACTO SEXUAL en las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
Estoy mucho menos tranquilo durante la estimulación previa/coito que antes de la impotencia				Igual	Estoy mucho más tranquilo durante la estimulación previa/coito que antes de la impotencia			

8) ¿Cómo valoraría los ORGASMOS QUE HA EXPERIMENTADO en las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
El orgasmo no es, ni mucho menos, tan placentero como antes				Igual	El orgasmo es mucho más placentero que antes			

9) ¿Cómo valoraría su PLACER GENERAL al hacer el amor durante las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
En general siento mucho menos placer durante la estimulación previa/coito que antes de la impotencia				Igual	En general siento mucho más placer durante la estimulación previa/coito que antes de la impotencia			

10) ¿Cómo valoraría en general EL PLACER QUE HA OBTENIDO SU PAREJA en las relaciones sexuales durante las últimas 4 semanas, en comparación con el período anterior a la aparición de la impotencia?

-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
?				?				?
En general, la estimulación previa/coito no son, ni mucho menos, tan placenteros como antes de la impotencia				Igual	En general, la estimulación previa/coito son mucho más placenteros que antes de la impotencia			

# Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS)

Los médicos conocen la importancia de los factores emocionales en la mayoría de enfermedades. Si el médico sabe cuál es el estado emocional del paciente puede prestarle entonces mejor ayuda.

Este cuestionario ha sido confeccionado para ayudar a que su médico sepa cómo se siente usted afectiva y emocionalmente. No es preciso que preste atención a los números que aparecen a la izquierda. Lea cada pregunta y subraye la respuesta que usted considere que coincide con su propio estado emocional en la última semana.

No es necesario que piense mucho tiempo cada respuesta; en este cuestionario las respuestas espontáneas tienen más valor que las que se piensan mucho.

---

A.1. Me siento tenso/a o nervioso/a:

3. Casi todo el día
2. Gran parte del día
1. De vez en cuando
0. Nunca

---

D.1. Sigo disfrutando de las cosas como siempre:

0. Ciertamente, igual que antes
1. No tanto como antes
2. Solamente un poco
3. Ya no disfruto con nada

---

A.2. Siento una especie de temor como si algo malo fuera a suceder:

3. Sí, y muy intenso
2. Sí, pero no muy intenso
1. Sí, pero no me preocupa
0. No siento nada de eso

---

D.2. Soy capaz de reírme y ver el lado gracioso de las cosas:

0. Igual que siempre
1. Actualmente, algo menos
2. Actualmente, mucho menos
3. Actualmente, en absoluto

---

A.3. Tengo la cabeza llena de preocupaciones:

3. Casi todo el día
2. Gran parte del día
1. De vez en cuando
0. Nunca

---

D.3. Me siento alegre:

3. Nunca
2. Muy pocas veces
1. En algunas ocasiones
0. Gran parte del día

---

A.4. Soy capaz de permanecer sentado/a tranquilo/a y relajado/a:

0. Siempre
1. A menudo
2. Raras veces
3. Nunca

---

D.4. Me siento lento/a y torpe:

3. Gran parte del día
2. A menudo
1. A veces
0. Nunca

---

A.5. Experimento una desagradable sensación de «nervios y hormigueos» en el estómago:

0. Nunca
1. Sólo en algunas ocasiones
2. A menudo
3. Muy a menudo

D.5. He perdido el interés por mi aspecto personal:

3. Completamente
2. No me cuido como debería hacerlo
1. Es posible que no me cuide como debiera
0. Me cuido como siempre lo he hecho

A.6. Me siento inquieto/a como si no pudiera parar de moverme:

3. Realmente mucho
2. Bastante
1. No mucho
0. En absoluto

D.6. Espero las cosas con ilusión:

0. Como siempre
1. Algo menos que antes
2. Mucho menos que antes
3. En absoluto

A.7. Experimento de repente sensaciones de gran angustia o temor:

3. Muy a menudo
2. Con cierta frecuencia
1. Raramente
0. Nunca

D.7. Soy capaz de disfrutar con un buen libro o con un buen programa de radio o televisión:

0. A menudo
1. Algunas veces
2. Pocas veces
3. Casi nunca







## IMPRESIÓN CLÍNICA GLOBAL- MEJORÍA GLOBAL (ICG-MG)

Comparado con el estado inicial, ¿cómo se encuentra el paciente en estos momentos? (Puntúe la mejoría total independientemente de que a su Juicio se deba o no por completo al tratamiento).

0. no evaluado
1. mucho mejor
2. moderadamente mejor
3. levemente mejor
4. sin cambios
5. levemente peor
6. moderadamente peor
7. mucho peor



