

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RODRIGO BERTOLLO DE ALEXANDRE

**Uma análise dos membros da via do AMP cíclico e GMP cíclico em pacientes  
com câncer de próstata: A variabilidade genética do gene PRKAR1A e da família  
das fosfodiesterases**

**CURITIBA**

**2013**

RODRIGO BERTOLLO DE ALEXANDRE

**Uma análise dos membros da via do AMP cíclico e GMP cíclico em pacientes  
com câncer de próstata: A variabilidade genética do gene PRKAR1A e da família  
das fosfodiesterases**

Tese apresentada ao curso de Doutorado  
em Ciências da Saúde da Pontifícia  
Universidade Católica do Paraná, como  
requisito à obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto  
Mayora Aita

**CURITIBA**

**2013**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

A381a Alexandre, Rodrigo Bertollo de  
2013 Uma análise dos membros da via do AMP cíclico e GMP cíclico em  
pacientes com câncer de próstata : a variabilidade genética do gene  
PRKARIA e da família das fosfodiesterases / Rodrigo Bertollo de Alexandre  
; orientador: Carlos Alberto Mayora Aita. – 2013.  
124 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2013

Bibliografia: f. 71-103

1. Próstata – Câncer. 2. Diester fosfórico Hidrolases. 3. GMP cíclico. I.  
Aita, Carlos Alberto Mayora. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.99463

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

Aos dezoito dias do mês de março de 2013, realizou-se a sessão pública de defesa de tese "UMA ANÁLISE DOS MEMBROS DA VIA DO AMP CÍCLICO E GMP CÍCLICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA: A VARIABILIDADE GENÉTICA DO GENE PRKAR1A E DA FAMÍLIA DAS FOSFODIESTERASES" apresentada por RODRIGO BERTOLLO DE ALEXANDRE para obtenção do título de doutor; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita (PUCPR) - Presidente	
Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira (PUCPR)	
Profª. Drª. Renata Iani Werneck (PUCPR)	
Prof. Dr. Fabricio Klerynton Marchini (ICC)	
Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita Parecer: APROVADO  
 Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira Parecer: Aprovado  
 Profª. Drª. Renata Iani Werneck Parecer: Aprovado  
 Prof. Dr. Fabricio Klerynton Marchini Parecer: Aprovado  
 Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza Parecer: APROVADO  
 Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Assinam as observações da banca para o título final.

  
 Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita  
 Presidente da Banca Examinadora

  
 Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho  
 Coordenador do PPGCS PUCPR

## RESUMO

O câncer de próstata (CP) é o pior tipo de câncer em homens com mais de 60 anos devido ao número crescente de pacientes diagnosticados e levados à óbito pela doença. Acredita-se que, independentemente da existência de um histórico familiar como um fator de risco para o desenvolvimento da doença, a incidência do câncer de próstata esporádico também é muito alta. Apesar de ser uma doença relativamente comum, a maior parte dos genes associados atualmente com a doença apresentam resultados controversos e ainda não foi possível encontrar um marcador molecular capaz de prever as chances do aparecimento da doença. Altos níveis do segundo mensageiro AMP cíclico e a associação entre GMP cíclico com diversos tipos de cânceres, incluindo o câncer de próstata, já foram bem estabelecidas. Devido a esse fato, foi criada a hipótese de que o principal alvo do AMP cíclico na próstata (a subunidade regulatória do tipo 1 $\alpha$  da proteína quinase A) e os responsáveis por hidrolisar esses segundos mensageiros no meio intracelular (as fosfodiesterases), também possam estar envolvidos no processo de tumorigênese. O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética existente na principal subunidade regulatória da Proteína Quinase A (*PRKAR1A*) e os genes das fosfodiesterases (PDEs). Para isso foram utilizadas 16 amostras de origem de tecido somático (tecido prostático carcinogênico) para a análise completa de todos estes genes através da plataforma SOLiD. Todos os polimorfismos encontrados por SOLiD foram comparados com a base de dados do projeto *1000 Genome* para garantir que mutações raras também fossem incluídas na análise. Nesta análise foram encontrados 19 polimorfismos PDEs com significância estatística ( $p < 0,05$ ) e 17 possíveis mutações não descritas anteriormente. No entanto, todas as variantes encontradas para os genes *PRKAR1A* e *PDE5A* nesses 16 pacientes, também foram testadas em outras 32 amostras de CP de origem de tecido somático através da técnica de sequenciamento do tipo Sanger. Nessa análise foi possível encontrar duas alterações genéticas no gene *PDE5A* com probabilidade de estarem associadas à doença [ $p = 0,034$  OR-16,1 (95% CI, 1,44-179);  $p = 0,052$  OR-0,51 (95% CI, 0,26-0,99)]. Foi possível concluir que o gene *PDE5A* pode estar associado com o desenvolvimento do CP, e que, através das análises obtidas pelo SOLiD 4, existem desarranjos genéticos em vários dos genes das PDEs que podem estar relacionados ao surgimento do câncer de próstata.

Palavras chaves: cAMP; cGMP; Fosfodiesterases; PDE5A; PRKAR1A;

## ABSTRACT

Prostate cancer is the worst type of cancer in men over 60 years due to the increasing number of patients diagnosed and its mortality. It is believed that, regardless of the existence of a family history as the major risk factor for developing the disease, the incidence of sporadic prostate cancer is also very high. Despite of being a relatively common disease, most of the genes that are currently associated with it have shown controversial results. Furthermore, it has not yet been possible to find a molecular marker able to predict the chances of disease onset. High levels of the second messenger cyclic AMP and cyclic GMP was already associated with various types of cancers, including prostate cancer. Due to this fact, it was created the hypothesis that the primary target of cyclic AMP in the prostate (the type 1 $\alpha$  regulatory subunit of protein kinase A) and those responsible for these hydrolyze the intracellular second messengers (the PDE family), may also be involved in tumorigenesis. The main objective of this thesis was to characterize the genetic variability of the main regulatory subunit of protein kinase A (*PRKARIA*) and genes of phosphodiesterases (PDEs). For that, 16 samples of somatic tissue (prostate tissue carcinogen) were used through SOLiD platform to analyze these genes. All polymorphisms found by SOLiD were compared with the database of the 1000 Genome Project to ensure that rare mutations were also included in the analysis. This analysis found 19 polymorphisms with statistical significance ( $p < 0.05$ ) in the PDEs and 17 possible mutations not previously described. However, all variants of the genes found to *PRKARIA* and *PDE5A* were also tested on other 32 samples with somatic prostate cancer tissue using the technique of Sanger sequencing. In this analysis it was possible to find two genetic alterations in the gene *PDE5A* likely to be associated with the disease [ $p = 0.034$  OR-16, 1 (95% CI, 1.44 to 179),  $p = 0.052$  OR-0, 51 (95% CI 0.26-0.99)]. It was concluded that the gene *PDE5A* may be associated with the development of CP, and that through the analysis obtained by SOLiD 4, there are genetic disorders in several genes of PDEs that can be related to the onset of prostate cancer.

Key words: cAMP, cGMP; Phosphodiesterases; PDE5A; PRKAR1A;

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – NÚMERO ESTIMADO DE NOVOS CASOS PARA CP NOS ANOS DE 2009 À 2012 NOS ESTADOS UNIDOS.....	11
FIGURA 2 - A SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MEDIADA POR CAMP OU cGMP.....	17
FIGURA 3 - SELETIVIDADE DAS DIFERENTES PDEs. ....	19
FIGURA 4 - ESTRUTURA GERAL DAS FOSFODIESTERASES.....	19
FIGURA 5 - CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS DOMÍNIOS PROTEICOS DAS PDEs. ....	22
FIGURA 6 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES PDEs 1A E 1C EM TECIDO PROSTÁTICO. 23	
FIGURA 7 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DO PDE2A EM TECIDO PROSTÁTICO.....	24
FIGURA 8 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES DE PDE4 EM TECIDO PROSTÁTICO.....	27
FIGURA 9 - CARACTERIZAÇÃO DAS 3 ISOFORMAS DE PDE5A .....	28
FIGURA 10 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DO PDE5A E nNOS EM TECIDO PROSTÁTICO .....	31
FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES PDE8 EM TECIDO PROSTÁTICO .....	34
FIGURA 12 - COMPARAÇÃO DE EXPRESSÃO DO PDE9A EM TECIDO PROSTÁTICO.....	35
FIGURA 13 - SEQUÊNCIA DE PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES COM AS 48 AMOSTRAS.....	45
FIGURA 14 - Os 218 SNPs ENCONTRADAS PELOS DOIS PROGRAMAS DISTINTOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE VARIAÇÕES DO SOLiD. ....	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIFERENCIAÇÃO DAS PDEs.....	18
TABELA 2 - EXPRESSÃO DAS PDEs NA PRÓSTATA. ....	20
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS INDIVIDUAIS DE CADA PACIENTE.....	41
TABELA 4 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES DOS ÉXONS DOS GENES PRKAR1A E PDE5A. ....	46
TABELA 5 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA A PCR.....	46
TABELA 6 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA A REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO. ....	47
TABELA 7 - NÚMERO DE LEITURAS POR AMOSTRA.....	50
TABELA 8 - ANÁLISE DOS 10 SNPs NO GENE DA PROTEÍNA PDE5A POR SEQUENCIAMENTO DO TIPO SANGER NOS 48 PACIENTES COM CP. ....	54
TABELA 9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA EM RELAÇÃO A FREQUÊNCIA ALÉLICA, ENTRE A POPULAÇÃO MUNDIAL E ENTRE EUROPEUS DOS 10 POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NOS SEIS GENES PARA TESTAR A HOMOGENEIDADE DAS POPULAÇÕES.....	56
TABELA 10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS 22 POLIMORFISMOS MAIOR SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA ENCONTRADOS EM TODOS OS GENES DAS PDEs. ....	57
TABELA 11 - FREQUÊNCIA DAS ALTERAÇÕES COM SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA NOS PACIENTE ANALISADOS E SEU POSSÍVEL EFEITO NA ESTRUTURA DA CADEIA DE AMINOÁCIDOS.....	58
TABELA 12 - LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES, EFEITOS E FREQUÊNCIAS. ....	59
TABELA 13 - COMBINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COM SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA EM SEUS RESPECTIVOS PACIENTES. ....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALL	(Controles de todas as populações)
APL	(Leucemia Promielocítica Aguda)
Ca <sup>2+</sup>	(Cálcio)
CaM	(Calmodulina)
cAMP	(Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico)
cGMP	(Guanosina cíclica 3',5'-monofosfato)
C-Terminal	(Carboxi-Terminal)
DT	(Pacientes com Câncer de Próstata)
eNOS	(Sintetase endotelial de óxido nítrico)
EUR	(Controles europeus)
GAF	(Do inglês <i>cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA</i> )
GWAS	(Do inglês <i>Genome-Wide Association</i> )
IL-13	(Interleucina)
LCCSCT	(Tumores de Células de Sertoli Calcificados)
LOH	(Perda de <i>Heterozigosidade</i> )
MAPK	(Do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
MAPK1	(Do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase 1</i> )
MGL	(Do inglês <i>Molecular Genetics Laboratory</i> )
mRNAs	(Ácido ribonucleico mensageiro)
NGS	(Do inglês <i>Next-Generation Sequencing</i> )
NICHD	(Do inglês <i>National Institute of Child Health and Human Development</i> )
nNOS	(Sintetases neural de óxido nítrico)
NO	(Óxido nítrico)
NOS	(Sintetases de óxido nítrico)
nsSNPs	(SNPs não sinônimas)

N-Terminal	(AMINO-Terminal)
PAS	(Do inglês <i>Period circadian protein</i> ; <i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein</i> )
CP	(Câncer de próstata)
PCR	(Reação em cadeia da polimerase)
PCRs	(Plural de PCR)
PDE	(Fosfodiesterases de nucleotídeo cíclicos)
PDE-11i	(Inibidores de PDE11)
PDE-5i	(Inibidores de PDE5A)
PDEs	(Plural de PDE)
PKA	(Proteína Quinase dependente de cAMP)
PKC	(Proteína Quinase C)
PKG	(Proteína Quinase dependente de cGMP)
PMP	(Do inglês <i>Pseudomyxoma peritonei cell line</i> )
PPH	(PolyPhen-2)
PSA	(Antígeno prostático específico)
qPCR	(PCR quantitativa)
REC	(Do inglês <i>receiver</i> )
SNP	(Polimorfismos de nucleotídeos únicos)
SNPs	(Plural de SNP)
sSNPs	(SNPs sinônimos)
TCLE	(Termo de consentimento livre e esclarecido)
UCRs	(Do inglês <i>Upstream conserved regulatory</i> )
UTR-3	(Região não traduzida sentido 3')
WGA	(Do inglês <i>Whole Genome Amplification</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 O CÂNCER DE PRÓSTATA .....	10
1.2 ATUAIS FORMAS DE DIAGNOSTICO .....	11
1.3 TÉCNICAS DE ABORDAGEM .....	13
1.4 GENES CANDIDATOS .....	14
1.4.1 <i>PRKARIA</i> .....	15
1.4.2 <i>PDEs</i> .....	16
1.5 JUSTIFICATIVA .....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
3.1 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA .....	40
3.2 AMPLIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO DE ÚLTIMA GERAÇÃO (NGS) .....	42
3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR) E SEQUENCIAMENTO POR SANGER .....	44
3.3 BIOINFORMÁTICA E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>
8.1 APÊNDICE 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE PACIENTES E POPULAÇÃO MUNDIAL .....	104
8.2 APÊNDICE 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE PACIENTES E EUROPEUS .....	111
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>118</b>
9.1 ANEXO 1 - PROTOCOLO POR SEQUENCIAMENTO POR SOLiD .....	118
9.2 ANEXO 2 - GENES ANALISADOS POR <i>AGILENT'S SURESELECT</i> .....	123
9.3 ANEXO 3 - PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO .....	124

## 1. INTRODUÇÃO

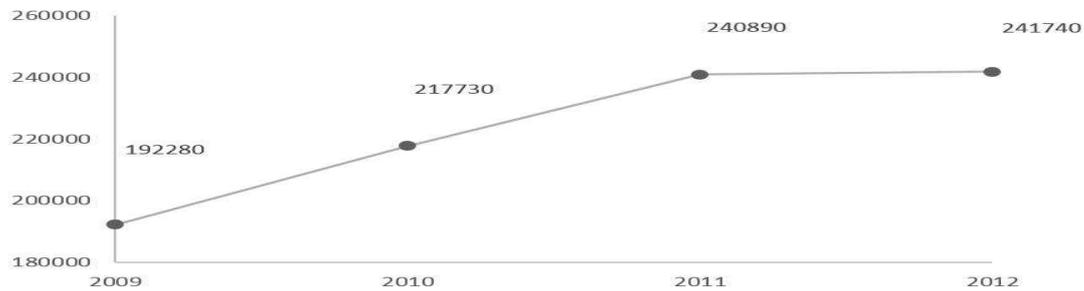
### 1.1 O CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata (CP) é um adenocarcinoma multifatorial que se origina nas células glandulares secretoras do líquido que compõe o sêmen ou nas células do lúmen. O grau de agressividade do CP é muito variável. Alguns tipos podem progredir para invasivo, potencialmente letal, enquanto outros permanecem latentes pelo resto da vida do indivíduo (Drudge-Coates e Turner, 2012). O surgimento deste câncer pode estar relacionado tanto a questões ambientais quanto genéticas, sendo que características relacionadas à alimentação, questões hormonais, estilo de vida e ao próprio microambiente interno aparentam aumentar as chances de predisposição (Hamid, Umbas *et al.*, 2011; Ligibel, 2012; Niclis, Diaz Mdel *et al.*, 2012; Stasiewicz, Staroslawska *et al.*, 2012). É interessante notar que apenas um quarto dos casos ocorre em pessoas com menos de 60 anos (Siegel, Naishadham *et al.*, 2012).

Esta neoplasia é muito comum entre homens nos Estados Unidos, sendo que dentre os cânceres, é a terceira maior causa de morte entre indivíduos de 60 a 79 anos e a segunda maior causa em indivíduos acima de 80 anos (Siegel, Naishadham *et al.*, 2012). As estimativas de novos casos de CP tem gradativamente aumentado a cada ano. Nos Estados Unidos Foi constatado um aumento de 49.460 novos casos esperados entre os anos de 2009 até 2012 (Jemal, Siegel *et al.*, 2009; Siegel, Naishadham *et al.*, 2012) (Figura 1). No Brasil a situação não é muito diferente, para o ano de 2012 o número esperado de novos casos era de 60.180 (Inca, 2007; 2011).

Os principais sinais da doença podem incluir sintomas como a dificuldade em iniciar e manter um jato contínuo de urina, sangue na urina, ato de ejacular ou urinar doloroso e disfunção erétil e sexual. Entretanto, uma grande maioria dos casos não apresentam sintomas (Miller, Hafez *et al.*, 2003). Deve-se lembrar que não existem formas de poder prever o aparecimento do CP, já que os únicos fatores de risco atualmente estabelecidos são: descendência Afro-Americana, idade avançada e histórico familiar (Walsh, 2011). Além desses fatores de risco genéticos, alguns estudos sugerem que o alto consumo de laticínios, carne vermelha, gordura saturada, fumo e doenças sexualmente transmissíveis também possam ser fatores para contribuir com o desenvolvimento desse câncer (Huncharek, Haddock *et al.*, 2010; Walsh, 2011).

Figura 1 – Número estimado de novos casos para CP nos anos de 2009 à 2012 nos Estados Unidos.



Nota: Entre os anos de 2009 até 2012 houve um crescimento no número esperado de novos casos de 49.460, sendo que as expectativas para este último ano foi de 241.740 novos casos.

Fonte: Informações adquiridas de artigos (Jemal, Siegel *et al.*, 2009; Jemal, Siegel *et al.*, 2010; Siegel, Ward *et al.*, 2011; Siegel, Naishadham *et al.*, 2012)

Devido a essa dificuldade de prever o aparecimento do CP, ainda hoje, o seu principal método de detecção laboratorial se limita nos níveis sanguíneos de antígeno prostático específico (PSA), que apesar de ser a técnica mais utilizada, possui grandes limitações. Um estudo que acompanhou 2.950 homens, de 62 a 91 anos, inscritos em um teste de prevenção do cancro da próstata, relatou que 26,9% dos homens com níveis de PSA entre 3,1 e 4,0 ng/mL (níveis normais para indivíduos com menos de 50 anos) tiveram câncer de próstata. Além disso, 17% dos homens com níveis de PSA entre 1,1 e 2,0 ng/mL (considerado normal para indivíduos com menos de 40 anos) também tiveram a doença (Thompson, Pauler *et al.*, 2004). Ainda mais, nos Estados Unidos, 75% dos homens que passam pelo processo de biópsia devido aos níveis de PSA entre o intervalo de 4,0 a 10,0 ng/mL (valor considerado acima do normal para indivíduos abaixo de 60 anos) demonstraram não possuir a doença (Barry, 2001).

## 1.2 ATUAIS FORMAS DE DIAGNOSTICO

Após o fator idade e etnia, o maior fator de risco epidemiológico para CP é o histórico familiar positivo (Alberti, 2010). Clinicamente, esse câncer foi definido em três diferentes formas epidemiológicas: esporádico (de ocorrência aleatória na população); familiar (com agrupamento aleatório de câncer na família); e hereditário (forte agrupamento e início de

desenvolvimento precoce em famílias) (Sacco, Prayer-Galetti *et al.*, 2005). Os tipos Hereditário e Familiar geralmente são identificados antes dos 55 anos e apesar de algumas subvariedades estarem normalmente associadas a um maior nível de agressividade, não se pode dizer que estes tipos possuem um pior prognóstico do que o do esporádico (Ferris-I-Tortajada, Garcia-I-Castell *et al.*, 2011). Além da idade e ocorrência, não é possível identificar outras características clínicas que poderiam auxiliar na identificação dessas diferentes formas epidemiológicas (Alberti, 2010).

Para que a classificação clínica seja do tipo familiar é necessário ter o diagnóstico de dois ou mais casos em parentes de primeiro ou segundo grau. Através de estudos epidemiológicos, foi documentado que indivíduos cujo pai ou um irmão é afetado possuem um risco de desenvolvimento de CP antes da idade de risco aumentado em duas a três vezes (Alberti, 2010). Além disso, esta chance aumenta de acordo com o número de indivíduos afetados. Na existência de dois membros afetados, o risco relativo é cinco vezes maior e quando existem três parentes, o risco sobe para 11 vezes (Ferris-I-Tortajada, Garcia-I-Castell *et al.*, 2011).

Para que seja classificado como do tipo hereditário existe um critério mais rigoroso a ser atendido: (a) possuir três ou mais parentes de primeiro grau afetados; (b) pelo menos três casos em parentes de primeiro ou segundo grau considerando a transmissão ligada ao cromossomo X; e (c) dois parentes de primeiro grau afetados antes dos 55 anos de idade (Ferris-I-Tortajada, Garcia-I-Castell *et al.*, 2011). Levando-se em consideração o fato de que o câncer de próstata é uma doença exclusivamente masculina, quando em doenças ligadas ao cromossomo X, a classificação do tipo hereditário pode ser subestimada por não ocorrer nas mães que transmitirão aos seus filhos. Os casos ligados a polimorfismos de baixa penetrância ou com influência de condições ambientais, compõem os tipos esporádicos e familiar (Alberti, 2010; Ferris-I-Tortajada, Garcia-I-Castell *et al.*, 2011).

No entanto, a classificação esporádica dessa doença é a mais ampla. Além de considerar casos sem o histórico familiar, também é o tipo mais associado a efeitos ambientais e com mutações do tipo somáticas. Acredita-se que para o câncer esporádico exista a interferência de vários genes distintos, sendo que cada alteração genética associada à doença, em média, poderia aumentar os riscos em 1,1 a 1,65 vezes. Desta forma, um conjunto de quatro ou cinco alterações em um único indivíduo poderia ser responsável por aumentar as chances de aparecimento da doença em até cinco vezes (Alberti, 2010).

### 1.3 TÉCNICAS DE ABORDAGEM

Acredita-se que não existe um único gene responsável por desenvolver esse câncer, principalmente nos tipos esporádicos e familiares, assim como não é imaginado a existência de apenas um único tipo de CP, mas sim vários. Essa hipótese poderia esclarecer a dificuldade encontrada nos dias atuais de identificar os diferentes genes responsáveis, já que a maior parte das análises realizadas teriam como amostras diferentes subtipos da doença. Mesmo os estudos utilizando *Genome-Wide Association* (GWAS) foram ineficazes para encontrar os genes responsáveis pela herdabilidade da doença. Alguns pesquisadores acreditam que talvez a incapacidade de encontrar os polimorfismos alvos responsáveis seja devido ao fato de que é improvável que, um dia, essa técnica seja capaz de abordar todos os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) comuns (Gibson, 2010). Outros acreditam que talvez vários SNPs em conjunto, e de pouca relevância, sejam responsáveis pelo desenvolvimento de doenças herdadas (Womack, Jang *et al.*, 2012), o que também seria muito difícil de detectar apenas por GWAS já que estes SNPs poderiam ainda não terem sido descobertos (Gibson, 2010). Por mais que algumas das doenças já tenham sido parcialmente explicadas pela técnica, elas ainda estão limitadas a uma porção dos indivíduos afetados e não é possível estimar as chances para os que ainda não foram (Gibson, 2010).

A falta de abrangência encontrada na técnica GWAS é facilmente suplementada pela técnica de Sequenciamento de última geração (NGS do inglês *Next-Generation Sequencing*), tanto quando analisados através de sequenciamento do genoma completo ou de exoma completo (sequenciamento do genoma inteiro ou apenas dos éxons respectivamente) (Ng e Kirkness, 2010). Nos dias atuais existem inúmeros sistemas para realizar o NGS e o constante crescimento desses faz com que ocorra uma redução dos custos da técnica e, dessa forma, facilitando a identificação das doenças de uma forma muito mais abrangente e que, sem dúvida, revolucionará o aconselhamento genético (O'daniel e Lee, 2012; Yu, Wu *et al.*, 2012). No entanto, devido ao montante de dados gerados por esses sequenciamentos, as condições atuais de análises estatísticas e os *softwares* disponíveis, não estão preparados para utilizar esses algoritmos que permitam analisar o genoma como um todo, mas apenas algumas regiões individualmente. Esse impedimento nos força a escolher vias metabólicas ou famílias de genes na tentativa de esclarecer melhor a doença.

Ainda hoje não foi possível encontrar mutações causais responsáveis pelo desenvolvimento do CP, acredita-se que estudos proteômicos podem se tornar essenciais para se descobrir novos marcadores tumorais. A identificação de biomarcadores e a expressão genética em diferentes estados do câncer, quando comparados com tecidos normais, podem desvendar não só a etiologia molecular da doença, mas também novos métodos para detecção, reduzindo assim, resultados falsos positivos e biópsias desnecessárias (Leman e Getzenberg, 2009).

#### 1.4 GENES CANDIDATOS

A história da genética relativa ao câncer de próstata, apesar de todos os esforços dedicados por vários grupos e pesquisadores, traz resultados bastante insatisfatórios pelo fato de que a maior parte das análises obtidas até o momento são contraditórias. Atualmente já foram identificados cerca de 140 genes com mutações que conferem uma vantagem seletiva de crescimento para a célula tumoral (*driver mutations*), considerados como condutores pelo desenvolvimento de cânceres (*driver genes*) (Vogelstein, Papadopoulos *et al.*, 2013) . Porém, para o CP, ainda não está estabelecido quais são as mutações condutoras e quais são as mutações pré-neoplásicas que não exercem efeitos diretos ou indiretos sobre a doença (*passenger mutations*). No entanto, alguns autores estão tentando identificar esses possíveis genes condutores para o CP através de estudos bibliográficos com a comparação de todos os resultados já obtidos até o momento sobre a doença (Sunkel e Wang, 2012; Vogelstein, Papadopoulos *et al.*, 2013).

No entanto, a cada ano que passa vários, novos *loci* e novos genes são associados com o desenvolvimento do CP (Smith, Freije *et al.*, 1996; Berthon, Valeri *et al.*, 1998; Gibbs, Chakrabarti *et al.*, 1999; Gudmundsson, Sulem *et al.*, 2008; Yeager, Chatterjee *et al.*, 2009; Takata, Akamatsu *et al.*, 2010; Haiman, Chen *et al.*, 2011; Kote-Jarai, Olama *et al.*, 2011). Uma região bastante analisada por estudos de GWAS e outras técnicas , por ser possivelmente associada à doença, foi a região 17q, mais especificamente 17q24.3 (Gudmundsson, Sulem *et al.*, 2007; Eeles, Kote-Jarai *et al.*, 2008; Sun, Purcell *et al.*, 2008; Eeles, Kote-Jarai *et al.*, 2009; Penney, Salinas *et al.*, 2009).

Um dos genes presentes no *locus* 17q24.3 cromossômico é o gene *PRKARIA* (Bertherat, Groussin *et al.*, 2003). Este gene expressa uma proteína que está intimamente ligada ao funcionamento dos genes responsáveis pela produção das fosfodiesterases (PDEs) (Horvath, Boikos *et al.*, 2006; Horvath, Giatzakis *et al.*, 2008; Linglart, Fryssira *et al.*, 2012). Juntos, eles trabalham na modulação dos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) na célula (Stratakis, 2012). Inúmeros trabalhos mostram a importância da via metabólica da qual este segundo mensageiro faz parte e o seu envolvimento com neoplasias (Bimpaki, Nesterova *et al.*, 2009; Almeida e Stratakis, 2011; Almeida, Azevedo *et al.*, 2012) e demonstra-se importante para o desenvolvimento do CP (Sarwar, Sandberg *et al.*, 2013).

#### 1.4.1 *PRKARIA*

O gene *PRKARIA* é o responsável por codificar a principal subunidade regulatória da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) R1 $\alpha$ , que é a principal mediadora da sinalização de cAMP em mamíferos (Jia, Tong *et al.*, 2004; Chen, Ginty *et al.*, 2005; Dodge-Kafka, Soughayer *et al.*, 2005). As moléculas de cAMP são segundos mensageiros que se ligam as subunidades regulatórias da PKA, ocorrendo assim uma alteração conformacional reversível, levando a liberação das subunidades catalíticas responsáveis pela fosforilação de diversas proteínas e consequentemente pela transmissão da sinalização (Tasken, Skalhegg *et al.*, 1997).

Sabe-se que o tecido que compõe a próstata é altamente sensível aos níveis de cAMP (Faucz, Horvath *et al.*, 2011), e diversos estudos já demonstram os efeitos positivos na inibição da proteína PKA (Wang, Jones *et al.*, 2006; Chung, Furihata *et al.*, 2009; Desiniotis, Schafer *et al.*, 2010). Assim, quaisquer alterações na sequência de DNA do gene *PRKARIA* que possam interferir na formação da proteína poderiam ser responsáveis por um aumento da atividade do complexo proteico PKA. Essa desestabilização da homeostase pode levar à perda do controle do ciclo celular, devido a um aumento no nível de sinalização por cAMP (Stratakis e Kirschner, 1998; Stratakis, Kirschner *et al.*, 2001; Bourdeau e Stratakis, 2002), e esse gene pode se tornar um grande alvo de estudo por estar localizado na proximidade do *locus* 17q22-24, posição a qual já foi fortemente associada à doença. Até o momento, não existem publicações que relacionam alterações genéticas entre *PRKARIA* e o CP.

### 1.4.2 PDEs

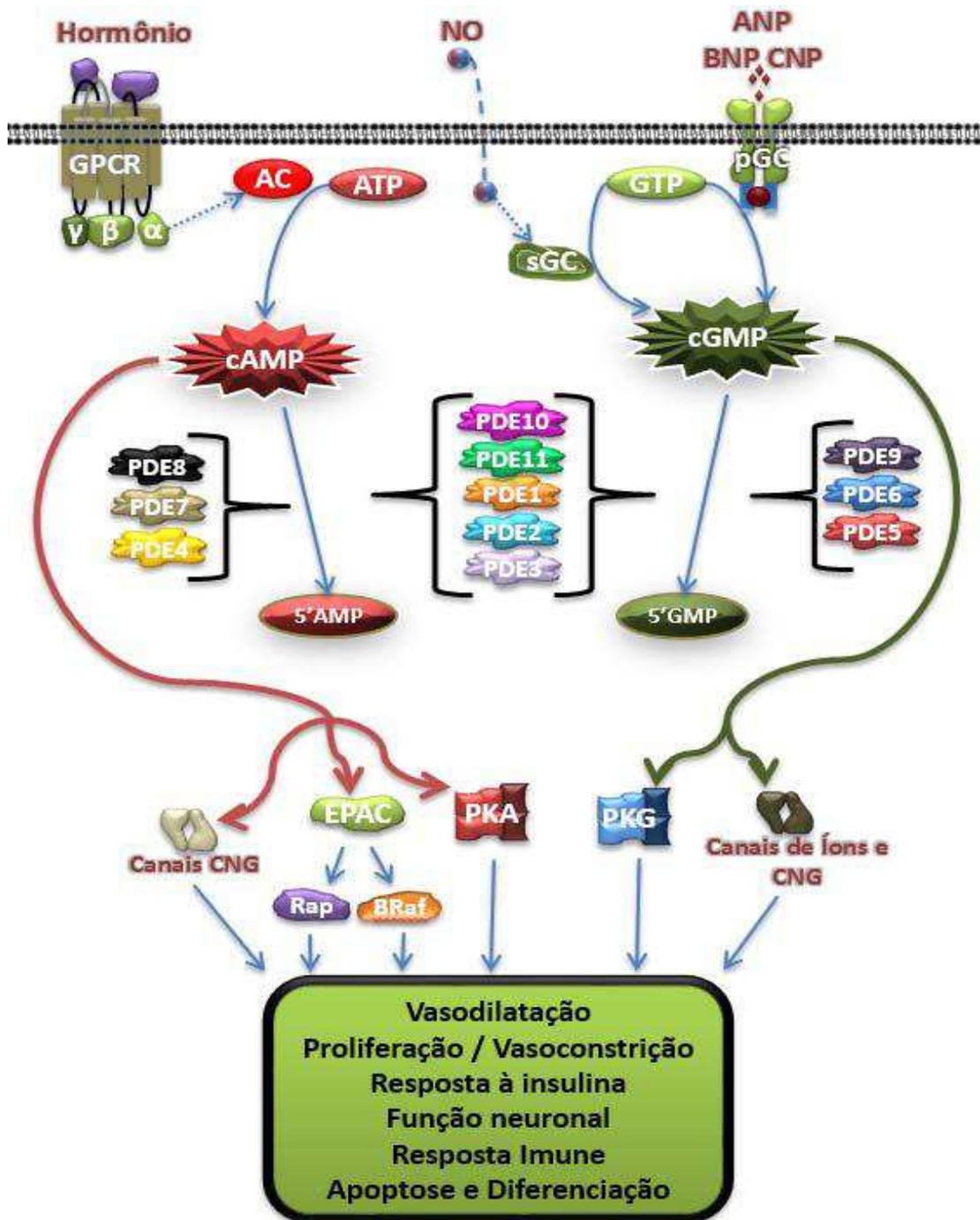
Considerando o fato de que o cAMP estaria diretamente relacionado à progressão da doença em estudo, seria imprescindível aceitar que os responsáveis pela hidrólise e o controle da sua quantidade também estariam envolvidos. As enzimas da família das PDEs, inicialmente descobertas no início da década de 1960 (Butcher e Sutherland, 1962), conseguem, por quebra da ligação fosfodiéster, hidrolisar as moléculas cAMP e cGMP (guanosina cíclica 3',5'-monofosfato) para 5'AMP e 5'GMP respectivamente (Figura 2).

A família das fosfodiesterases é composta por 11 isoenzimas que são codificadas por 21 genes, que expressam mais de 100 mRNAs devido a *splicings* alternativos e regiões promotoras diferentes (Bender e Beavo, 2006; Lugnier, 2006), sendo que muitas dessas isoformas desempenham funções específicas em diferentes tecidos (Keravis e Lugnier, 2010) (Tabela 1).

As 21 diferentes tipos de PDE são classificadas em 5 categorias, baseadas na sua capacidade e seletividade de hidrolisar cAMP ou cGMP (Figura 3). Dessa forma, por sua seletividade e atuação específica, são responsáveis por controlar a quantidade desses segundos mensageiros em diferentes órgãos, e assim, também alterando os níveis intracelulares de cálcio, a proliferação celular, a capacidade de transcrição, controlando inflamações através de diferentes vias (Figura 2) (Francis e Corbin, 1999).

De forma geral, as fosfodiesterases possuem estruturas proteicas bastante parecidas. Essas proteínas podem ser divididas em 3 principais partes: região (N) amino-terminal; região do sítio catalítico; e Região (C) carbóxi-terminal. Na região N-Tterminal, dependendo de cada PDE, geralmente encontram-se sítios de fosforilação (responsáveis pela atividade da proteína), domínios regulatórios, sítios de ligação, sítios de associação de membranas e *motifs* de dimerização. Na região do sítio catalítico encontra-se um domínio de ligação de metais (Zn e Mg), o qual é essencial para o funcionamento e sinalização da enzima, denominado *HD domain* (Aravind e Koonin, 1998) e o sítio catalítico. Por último, a região C-terminal é passível de fosforilação (Baillie, Mackenzie *et al.*, 2000) ou isoprenilação (Anant, Ong *et al.*, 1992) pelas MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) (Keravis e Lugnier, 2010) (Figura 4).

Figura 2 - A sinalização intracelular mediada por cAMP ou cGMP.



Nota: Esta sinalização não é apenas controlada pela produção dos nucleotídeos cíclicos em resposta a estímulos extracelulares, mas também pela hidrólise mediada por PDE destes nucleotídeos cíclicos.

Fonte: o autor.

Tabela 1 - Diferenciação das PDEs.

Família do Gene	Expressão tecido específica	Gene	Número de RNAs Transcritos	Isoformas Codificadoras de Proteínas	Total de Exons	Tamanho Médio de AA	Localização Cromossômica
<b>PDE1</b>	Cérebro, músculo liso, coração, pulmão, testículo, próstata, linfócitos, macrófagos	PDE1A	12	8	40	530	2q32.1
		PDE1B	2	2	17	530	12q13
		PDE1C	11	6	48	580	7p15.1-p14.3
<b>PDE2</b>	Cérebro, suprarrenal, coração, fígado, plaquetas, células endoteliais	PDE2A	11	8	69	850	11q13.1-q14.1
<b>PDE3</b>	Coração, músculo liso, adipócitos, plaquetas, hepatócitos, rim, células do sistema imunológico, próstata	PDE3A	1	1	16	1141	12p12
		PDE3B	2	2	17	731	11p15.2
<b>PDE4</b>	Ubíquo	PDE4A	7	7	28	700	19p13.2
		PDE4B	11	8	45	600	1p31
		PDE4C	4	4	23	630	19p13.11
		PDE4D	8	8	27	580	5q12
<b>PDE5</b>	Músculo liso, plaquetas, cerebelo, pulmão, rim, coração, próstata	PDE5A	5	5	29	800	4q27
<b>PDE6</b>	Fotorreceptores da retina	PDE6A	1	1	22	860	5q31.2-q34
		PDE6B	12	8	47	500	4p16.3
		PDE6C	2	1	25	858	10q24
<b>PDE7</b>	Músculo esquelético, células do sistema imunológico, o cérebro, coração, testículos, próstata	PDE7A	3	3	16	450	8q13
		PDE7B	3	3	17	400	6q23-q24
<b>PDE8</b>	Testículos, ovário, fígado, coração, cólon, cérebro, glândula tireoide	PDE8A	5	3	49	800	15q25.3
		PDE8B	5	5	23	840	5q14.1
<b>PDE9</b>	Cérebro, rins, baço, próstata	PDE9A	28	13	62	500	21q22.3
<b>PDE10</b>	Cérebro, testículos, tireoide, coração,	PDE10A	4	4	28	780	6q26
<b>PDE11</b>	Próstata, testículos, tireoide, suprarrenal, fígado	PDE11A	16	10	74	500	2q31.3

Nota: Principais localizações encontradas em relação a tecido específico. Classificação por família e suas respectivas isoenzimas; identificadas por tamanho, número de RNAs mensageiros, número de éxons, tamanho de amino ácidos (AA) e localização.

Fonte: o autor.

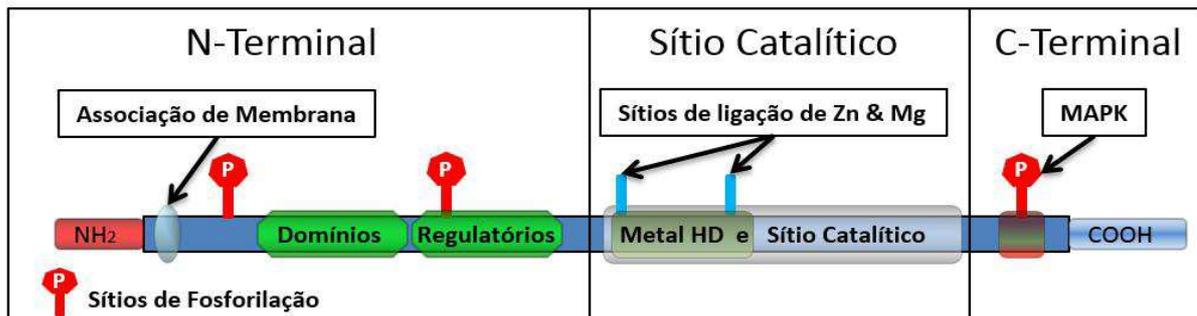
Figura 3 - Seletividade das diferentes PDEs.



Nota: Separação em 5 diferentes classes das 21 diferentes PDEs relacionadas a sua seletividade em relação a hidrólise de cAMP e cGMP.

Fonte: o autor.

Figura 4 - Estrutura geral das fosfodiesterases.



Nota: Divisão básica utilizada como padrão para todas as PDEs, sendo que dentro dessa divisão apenas as regiões N-terminal e C-terminal variam de acordo com cada PDE.

Fonte: o autor.

Até o momento, várias dessas 11 isoenzimas já foram descritas com algum tipo de relação com cânceres ou processos relacionados ao controle do crescimento, migração ou adesão celular. Mas, devido ao tamanho da família, ainda nos dias atuais não se encontram trabalhos capazes de relacionar as variações genéticas e o comportamento das proteínas como um todo em diferentes tipos de cânceres. Além disso, só existem estudos isolados com alguns desses genes. Não obstante o fato de que quase todas as PDEs são expressas na próstata (Tabela 2), apenas as PDEs 4, 5 e 11 foram estudadas com maior interesse nesse tecido.

Tabela 2 - Expressão das PDEs na próstata.

PDEs	Bexiga	Próstata	Uretra	Corpos Cavernosos
1	+	1A, 1B, 1C	+	1A, 1B, 1C
2	+	2A	+	2A
3	+	3A	3A	3A
4	+	4A, B, C, D	+	4A, B, C, D
5	5A1, 2, 3	5A1, 2, 3	+	5A1, 2, 3
6	?	6A, 6B, 6C	?	?
7	?	7A	?	7A
8	?	8A	?	8A
9	+	+++	?	+
10	?	10A	?	10A
11	-	+++	?	?

Nota: Tabela referente a expressão de todas as PDEs expressas na próstata. + Todas as isoformas são expressas/ +++ Todas as isoformas são muito expressas/ ? Expressão desconhecida.

Fonte: Tabela retirada do artigo de M.A. WHEELER (Wheeler, Ayyagari *et al.*, 2005) e adaptada e complementada por informações de outros artigos (Su, Wiltshire *et al.*, 2004; Lukk, Kapushesky *et al.*, 2010).

#### 1.4.2.1 PDE1

Essa subfamília se diferencia das demais pela sua regulação por  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaM), sendo que esse íon estimula a sua capacidade de hidrólise (Figura 5A) (Sonnenburg, Seger *et al.*, 1995; Yan, Zhao *et al.*, 1996). A PDE1A é conhecida por agir em resposta a lesões ou estímulos hormonais em células de músculo liso vascular e também está associada ao controle da proliferação, migração, apoptose e a produção de proteínas da matriz extracelular. No citoplasma do músculo liso está associada com o marcador contráctil calponina, enquanto no núcleo está associada a um marcador de crescimento Ki-67 (Nagel, Aizawa *et al.*, 2006).

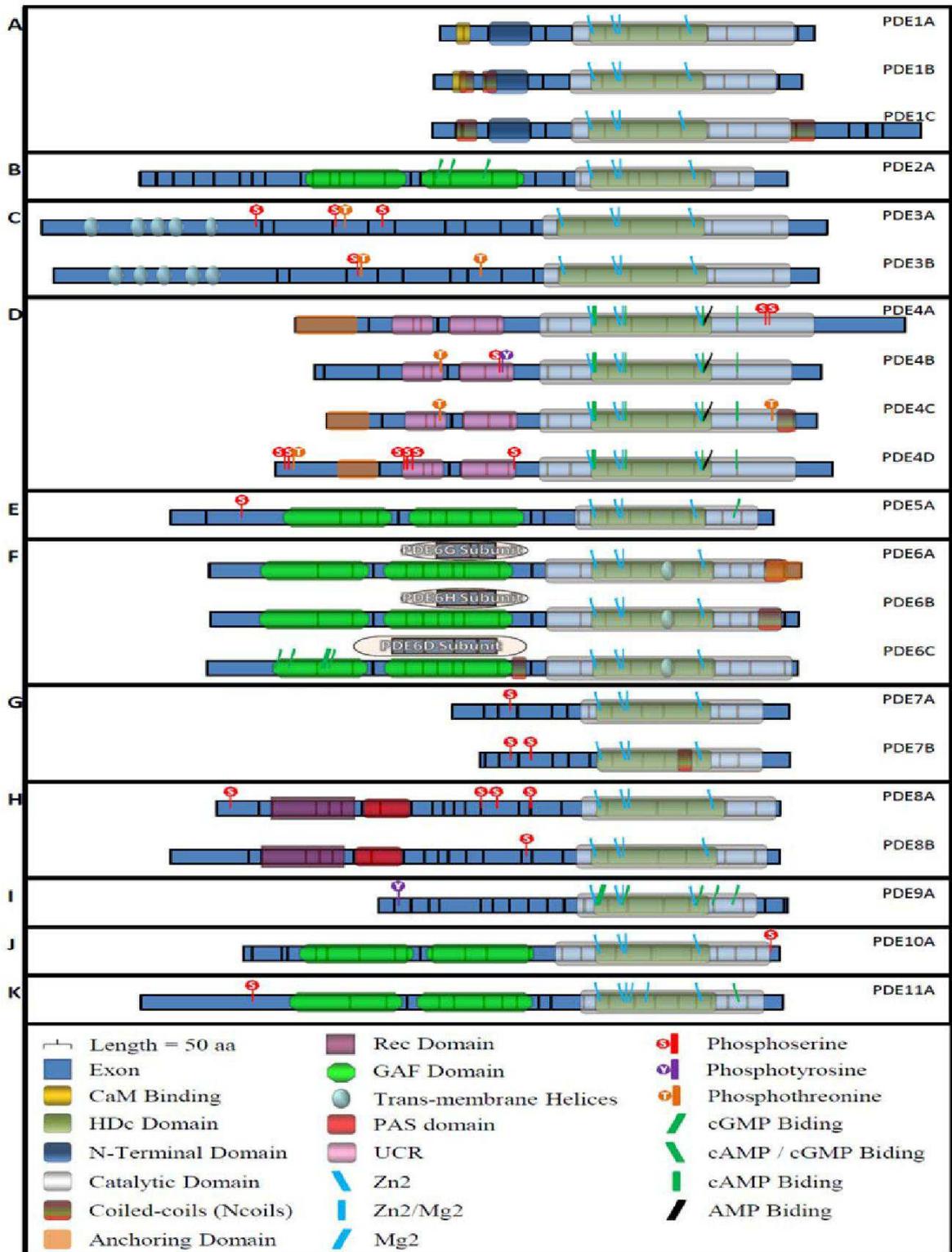
A segunda isoenzima da família, a PDE1B, ao contrário das suas isoformas, aparenta estar mais envolvida com fatores do sistema imune relacionados a doenças alérgicas pela regulação de IL-13 (Kanda e Watanabe, 2001) assim como influenciando a capacidade de locomoção e aprendizagem através da atuação no sistema nervoso central (Reed, Repaske *et al.*, 2002).

A PDE1C, assim como a PDE1A, demonstrou ser fundamental na regulação da proliferação de células lisas, uma vez que a sua expressão é ausente em músculo liso quiescente. No entanto, a sua expressão encontra-se aumentada a durante a proliferação de músculo liso em cultura e em células isoladas a partir de lesões ateroscleróticas (Rybalkin, Rybalkina *et al.*, 2002; Schermuly, Pullamsetti *et al.*, 2007; Jeon, Jono *et al.*, 2010).

Apesar de parecer se relacionar especificamente com certas partes do corpo e funções, o envolvimento da PDE1A com o câncer já foi descrito. A utilização de inibidores dessa PDE demonstraram um efeito positivo no combate ao câncer de pele do tipo melanoma (Abusnina, Keravis *et al.*, 2011). Estudos sobre o gene desta proteína mostram que ele aparenta ser um possível candidato para estudos relacionados ao tratamento de câncer cervical, já que por sua vez é capaz de inibir o crescimento celular e induz a apoptose (Zhang, Du *et al.*, 2012).

Não existem artigos específicos relacionados às PDE1 com CP e, no entanto, é possível encontrar um indício da relação da PDE1A e PDE1C com o câncer de próstata através de estudos de microarranjo disponíveis no banco de dados do ArrayExpress ([www.ebi.ac.uk/arrayexpress](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress)) (Institute, 2013) sob número de acesso E-MEXP-1243 (Figura 6). Em um trabalho que verifica o consumo de brócolis e a interação da via GSTM1 na próstata, foi encontrada uma pequena alteração dos níveis de expressão de PDE1A e PDE1C entre tecidos com alto grau de neoplasia intraepitelial prostática, câncer de próstata e hiperplasia benigna na próstata (Traka, Gasper *et al.*, 2008).

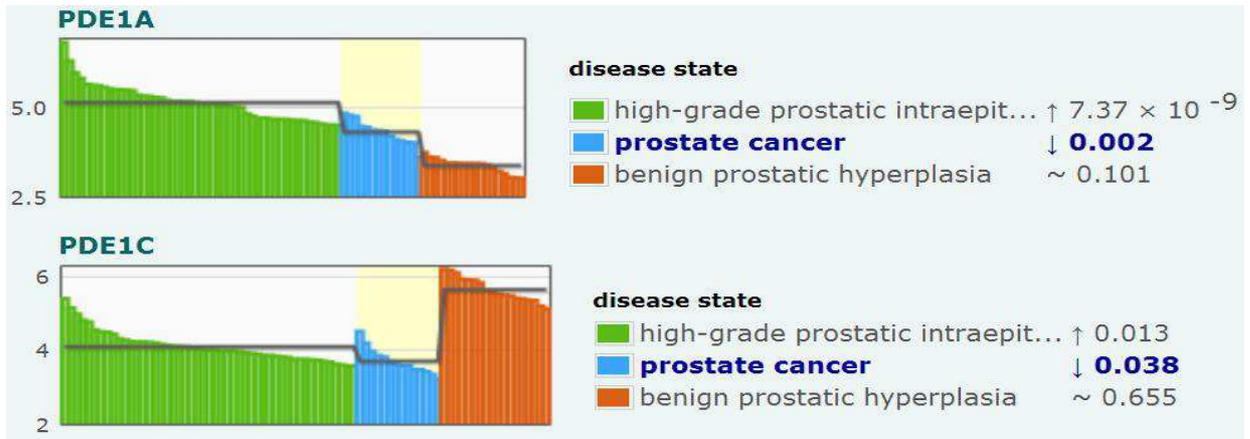
Figura 5 - Caracterização geral dos domínios proteicos das PDES.



Nota: Regiões das proteínas separadas pela localização previstas por Pfam, SMART ou InterPro (Hunter, Jones *et al.*, 2012; Letunic, Doerks *et al.*, 2012; Punta, Cogill *et al.*, 2012)

Fonte: o autor.

Figura 6 - Comparação de expressão dos genes PDEs 1A e 1C em tecido prostático.



Nota: Os números representam o valor de p ( $\chi^2$ ).

Fonte: Imagem retirada do banco de dados do ArrayExpress sob número de acesso E-MEXP-1243 (Institute, 2013).

#### 1.4.2.2 PDE2

A fosfodiesterase do tipo 2 é composta por apenas um único gene chamado *PDE2A*, capaz de gerar 12 transcritos de RNA, sendo que, destes, oito são codificados em proteína. Na sua região N-terminal existem 2 domínios de GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA) (GAF-A e GAF-B) (Mcallister-Lucas, Haik *et al.*, 1995) (Figura 5B). Os domínios do tipo GAF são sequências de aminoácidos específicas, encontradas em algumas proteínas, que possuem a capacidade de se ligar aos segundos mensageiros cAMP e cGMP. Essa ligação alostérica na *PDE2A* altera e aumenta a sua capacidade de catalisação de cAMP. Na *PDE2A*, essa união ocorre no domínio GAF-B e apenas com o cGMP (Erneux, Couchie *et al.*, 1981; Heikaus, Pandit *et al.*, 2009).

A relação entre mutações em *PDE2A* e câncer é quase desconhecida. No entanto, no início desse ano, análises da variação genética de cultivo de células PMP (*Pseudomyxoma peritonei cell line*) de melanoma oral maligno de humanos demonstraram a presença de mutações pontuais, podendo ser as responsáveis por afetar a progressão do ciclo celular através da modulação da expressão de ciclina A (*CCNA1*) (Morita, Murata *et al.*, 2013). Além disso, já foi descrito um aumento nos níveis de expressão de *PDE2A* em tumor adrenocortical (Durand, Lampron *et al.*, 2011), muito embora sua relação não está bem explicada. Erros no corpo da enzima e erros na região promotora do gene podem resultar em um aumento da sua quantidade

na célula. Pode ser sugerido que esse aumento também poderia ser oriundo de uma tentativa de compensação do organismo para tentar controlar um possível excesso dos segundos mensageiros livres intracelulares.

A relação da expressão de PDE2 no CP é inexistente, porém há expressão dessa enzima nas células endoteliais (Durand, Lampron *et al.*, 2011) e a sua relação com a regulação da migração celular e a capacidade de angiogênese (Netherton e Maurice, 2005) já está bem descrita. Isso sugere que PDE2 possui uma capacidade de auxiliar na malignidade do tumor. Além disso, os dados de microarranjo do *ArrayExpress* (Figura 7) demonstram uma alteração na quantidade de PDE2A entre diferentes tipos de tecidos danificados (Traka, Gasper *et al.*, 2008).

Figura 7 - Comparação de expressão do PDE2A em tecido prostático.



Nota: Os números representam o valor de p ( $\chi^2$ ).

Fonte: Imagem retirada do banco de dados do ArrayExpress sob número de acesso E-MEXP-1243 (Institute, 2013).

#### 1.4.2.3 PDE3

A família da PDE3 é conhecida pelo nome de cGMP-inibidora de PDE cAMP (Figura 5C). Isso significa, em termos gerais, que os membros conseguem mais facilmente hidrolisar cAMP do que cGMP. Entretanto, na presença de cGMP, a capacidade de degradação de cAMP é inibida (Meacci, Taira *et al.*, 1992; Beavo, 1995; Miki, Taira *et al.*, 1996). Através da análise de mutações de deleções da região N-terminal da PDE3A foi possível verificar um aumento na capacidade de hidrolização de cGMP em relação ao de cAMP. Desta forma os autores acreditam que na maioria das PDEs alterações na região N-terminal podem gerar a divergência entre substrato específico (Tang, Jang *et al.*, 1997).

Enquanto a expressão do *PDE3A* é mais frequentemente encontrada no coração, plaquetas, músculo liso da placenta e dos corpos cavernosos (Degerman, Belfrage *et al.*, 1997), o *PDE3B* é mais evidente no tecido adiposo (Miki, Taira *et al.*, 1996). Em camundongos *PDE3A*<sup>-/-</sup> *knockout*, ele causa um aumento nos níveis de sinalização cAMP-PKA, provocando maturação espontânea do óvulo, doenças cardiovasculares e alteração do controle do ciclo celular (Masciarelli, Horner *et al.*, 2004; Begum, Shen *et al.*, 2011). Níveis elevados de PKA e PKB podem ativar as *PDE3A* e *PDE3B*, respectivamente. A proteína 3A dessa família pode fosforilar e ativar proteína quinase C (PKC), enquanto a 3B pode, juntamente com PI3K-cAMP, estimular a sinalização de leptina no hipotálamo (Shakur, Holst *et al.*, 2001; Zhao, Huan *et al.*, 2002; Pozuelo Rubio, Campbell *et al.*, 2005).

Muito embora exista uma literatura ampla sobre os elevados níveis de cAMP em cânceres, até o momento não foi encontrada uma relação direta com as enzimas da família das *PDE3s*. Porém, um estudo realizado em 2001 registrou frequentes deleções cromossômicas em genes supressores tumorais em tecido afetado por CP entre a região 12p12-13, cuja localização envolve o *locus* do gene *PDE3A* (Dong, 2001). Um melhor entendimento dessas moléculas pode beneficiar o entendimento da utilização de compostos químicos que interfiram no seu funcionamento e, conseqüentemente, auxiliar o tratamento de tumores.

#### 1.4.2.4 PDE4

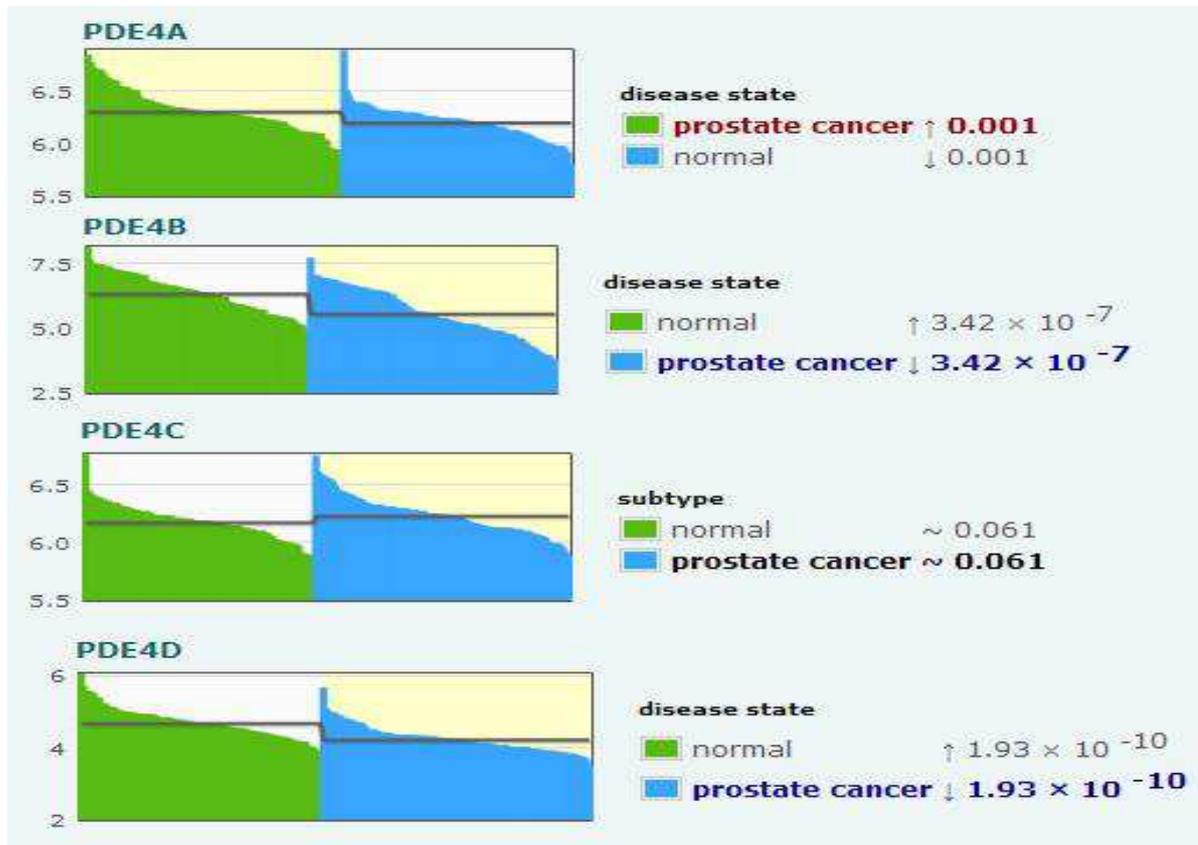
Entre todas as PDEs, a *PDE4* é a que está presente em um maior número de tecidos (Engels, Fichtel *et al.*, 1994; Engels, Sullivan *et al.*, 1995). É composta por quatro genes distribuídos em três cromossomos diferentes que, geram um total de 30 transcritos, sendo que, desses, 27 são codificados em proteínas. Essa PDE se distingue das demais por possuir duas regiões chamadas de UCRs (*upstream conserved regulatory*) (UCR1 e UCR2). Essas UCR correspondem a sequências de aminoácidos na região N-Terminal e são altamente conservadas entre as espécies e em todos os quatro genes. A UCR1 possui um total de 55 aminoácidos enquanto a UCR2 possui um total de 76 aminoácidos (Figura 5D). Nas isoformas mais completas desse gene é possível encontrar a sequência de bases para codificar ambas UCRs, enquanto nas isoformas menores é encontrada apenas a sequência para a segunda UCR. No entanto, existem isoformas “super pequenas” as quais não codificam nenhuma parte destas regiões (Houslay, Sullivan *et al.*, 1998; Houslay, 2001).

Acredita-se que, assim como os domínios GAFs, essas regiões denominadas UCR também possam influenciar na capacidade catalítica das PDEs (Conti e Jin, 1999). Estudos na terceira isoforma do gene *PDE4D* sugerem que ambas UCRs interagem de forma conjunta para formar o módulo regulatório (Lim, Pahlke *et al.*, 1999; Beard, Olsen *et al.*, 2000) controlado e ativado pelas proteínas PKA e MAPK1 (Hoffmann, Wilkinson *et al.*, 1998; Mackenzie, Baillie *et al.*, 2000).

Pode-se dizer que os membros da família PDE4 são, atualmente, os que mais se relacionam com o desenvolvimento de cânceres. Com exceção da PDE4C, todos os outros membros da família já tiveram algum tipo de associação com neoplasias (Gelman, 2012; Moon, Lee *et al.*, 2012; Tsunoda, Ota *et al.*, 2012; Pullamsetti, Banat *et al.*, 2013). Além disso, baixos níveis da PDE4B aparentam ativar a via metabólica da PKA e contribuem com a progressão de CP avançado (Kashiwagi, Shiota *et al.*, 2012). Através de informações disponíveis no banco de dados do *ArrayExpress*, sob número de acesso E-GEOD-6919 (Figura 8) (Institute, 2013), foi encontrada uma diminuição nos níveis de expressão dos transcritos das 3 isoenzimas (A, B e D) no tecido com CP metastático, quando comparado com o normal (Chandran, Ma *et al.*, 2007). Sabe-se que cerca de 85% da hidrólise de cAMP em linhagens celulares de próstata é realizada pela atividade conjunta da PDE3 e da PDE4 (Hamilton, Hu *et al.*, 2013) e a sua diminuição poderia indicar um aumento da quantidade livre de cAMP no tecido.

De forma geral, todos os membros dessa família estão envolvidos com o controle de processos inflamatórios, sendo que cada um possui um papel especial e não redundante no controle das funções das células (Page e Spina, 2011; Jin, Ding *et al.*, 2012). A relação entre inflamação crônica e cânceres já está descrita e bem caracterizada por influenciar diversos tipos de tumores como o de mama, pulmão, cólon, pâncreas (Mantovani, 2010; Del Prete, Allavena *et al.*, 2011; Chiba, Marusawa *et al.*, 2012; Herszenyi, Lakatos *et al.*, 2012; Romagnolo e Selmin, 2012; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012) e até mesmo na próstata (Romagnolo e Selmin, 2012; Stasiewicz, Staroslawska *et al.*, 2012; Vendramini-Costa e Carvalho, 2012).

Figura 8 - Comparação de expressão dos genes de PDE4 em tecido prostático.



Nota: Os números representam o valor de  $p$  ( $\chi^2$ ).

Fonte: Imagem retirada do banco de dados do ArrayExpress sob número de acesso E-GEOD-6919 (Institute, 2013).

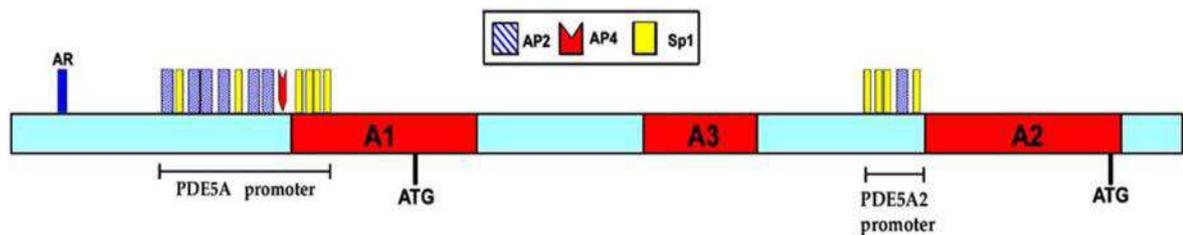
#### 1.4.2.5 PDE5

Dentro de todas as PDEs, o membro único da família PDE5, a PDE5A, é a mais conhecida por interagir com a próstata e, até mesmo, com o CP. O uso de medicamentos para a inibição dessa enzima é utilizado como forma de tratamento para a impotência masculina (Corbin, 2004), para melhorar a qualidade de vida após prostatectomia radical (Haffner, Landis *et al.*, 2005), para a diminuição nas chances de desenvolvimento de câncer de próstata (Chavez, Scott Coffield *et al.*, 2013), para controle da hipertensão pulmonar (Croom e Curran, 2008) e até mesmo para a recuperação e melhora na evolução no prognóstico de doenças cardiovasculares (Lee e Kass, 2012).

Este gene possui 3 isoformas (A1, A2 e A3) geradas por duas regiões promotoras. A primeira região promotora é capaz de expressar as isoformas A1 e A3, enquanto a segunda

isoforma é capaz de gerar apenas a isoforma A2 (Figura 9) (Lin, Lin *et al.*, 2006). A isoforma A2 é regulada positivamente por alguns de seus fatores de transcrição AP2 e Sp1 em sua região promotora (Lin, Chow *et al.*, 2001), através de cAMP e cGMP (Ahlgren, Suske *et al.*, 1999) por meio da PKA e da proteína quinase dependente de cGMP (PKG) (Zhong, Hammani *et al.*, 2000; Uchida, Oda *et al.*, 2002).

Figura 9 - Caracterização das 3 isoformas de PDE5A.



Nota: Diferenciação dos 3 primeiros éxons formando suas diferentes isoformas A1, A2 e A3 do gene *PDE5A* e suas duas regiões promotoras

Fonte: Retirado de um artigo (Lin, Lin *et al.*, 2006).

A sua expressão é detectada em quase todos os tipos de tecidos, principalmente em músculos lisos, plaquetas, tecidos vasculares do pênis, coração e, em grande quantidade, na próstata (Kotera, Fujishige *et al.*, 1999). Apenas a isoforma A3 é tecido específico de músculo liso (Lin, Chow *et al.*, 2001). Assim como a PDE2A, na região N-terminal da PDE5A existem 2 domínios GAF (GAF-A e GAF-B) (Figura 5E) que, de maneira oposta à outra família, possuem a capacidade de aumentar a capacidade de hidrolização de cGMP devido à fosforilação da enzima (Turko, Francis *et al.*, 1998; Zoraghi, Bessay *et al.*, 2005).

Os medicamentos inibidores de PDE5A (PDE-5i) mais conhecidos são: citrato de sildenafil, tadalafil e vardenafil. Essas drogas inibem em maior escala a PDE5 e em menor quantidade a PDE11A e PDE6A, evitando a degradação de cGMP para 5'GMP, causando vasodilatação pela despolarização dos canais de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  e aumentando os níveis intracelulares de PKG (Luedders, Muenz *et al.*, 2006). No início de 2012, um grupo descreveu que a ação conjunta da PDE5A e da PDE11A seria responsável pela inibição de cerca de 86% da atividade específica de cGMP em linhagens celulares de câncer de próstata. Também relatou que essas PDEs são expressas em maior quantidade em células de linhagens de tumor maligno (Hamilton, Hu *et al.*, 2013).

Recentemente, uma pesquisa demonstrou informações de grande interesse relacionadas à utilização de PDE-5i com o câncer de próstata. Essa pesquisa acompanhou durante sete anos dois grupos de indivíduos com disfunção erétil e com fatores de risco para CP similares, um que estava sob administração de PDE-5i e um outro que estava administrando. Durante esse período foi possível concluir que o grupo tratado teve uma menor tendência de desenvolver CP (Chavez, Scott Coffield *et al.*, 2013) e, ainda este ano, outros dois grupos distintos relataram que a utilização de PDE-5i, em conjunto com o chá verde, estimula a apoptose de células com câncer (Kumazoe, Sugihara *et al.*, 2013; Yang e Wang, 2013).

Apesar disso, as informações atuais a respeito dos níveis de cGMP em relação à capacidade de desenvolvimento da doença apresentam informações bastante contraditórias. O aumento dos níveis de cGMP pode fazer com que, em músculo liso, essa molécula também adquira a capacidade de ativar PKA (Forte, Thorne *et al.*, 1992; Cornwell, Arnold *et al.*, 1994) devido à alta similaridade com sítios regulatórios de PKG (Lincoln e Cornwell, 1993). O aumento desse segundo mensageiro também faz com que aumente os níveis de PKG, que por sua vez está relacionada ao aumento da proliferação celular por ativação da via das MAPK e indução de angiogênese quando em conjunto com VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Hood e Granger, 1998; Pyriochou, Zhou *et al.*, 2007). A via da PKG já foi associada ao câncer em diversos trabalhos, como na proliferação de células do câncer de mama (Karami-Tehrani, Fallahian *et al.*, 2012), músculo liso (Joshi, Martin *et al.*, 2012) e prevenção de apoptose espontânea em câncer de pulmão (Wong, Bathina *et al.*, 2012). Esses dados sugerem que o aumento dos níveis de PKG pode levar a um pior prognóstico da doença de câncer.

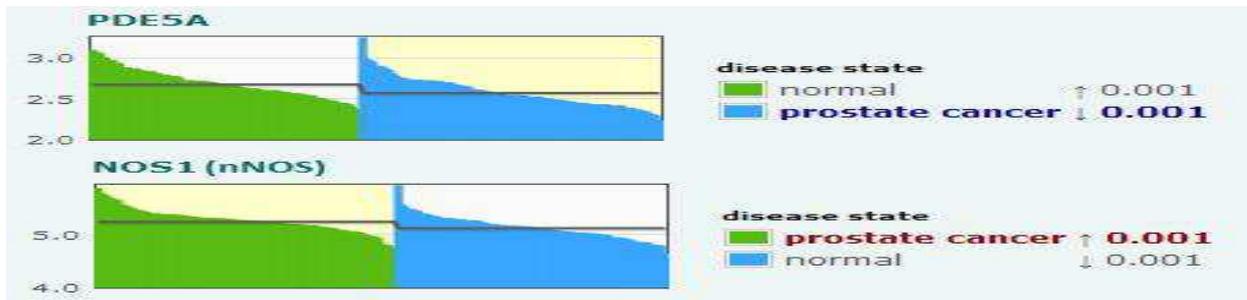
Além disso, a despolarização dos canais iônicos faz com que ocorra uma redução dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Burnett, 2006). Os altos níveis de cálcio conseguem ativar as sintetases de dois tipos de óxido nítrico (NOS) em músculo liso, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS). Conseqüentemente, essa diminuição pode impedir uma das formas de induzir a célula a entrar em apoptose por alvo da p53 devido à falta de altos níveis intracelulares de óxido nítrico (NO) (Griffith e Stuehr, 1995; Zhao, Francis *et al.*, 1997).

No entanto, a presença de NO é responsável por aumentar a produção de cGMP em até 200 vezes (Bian e Murad, 2003). Desta forma, a redução da produção dessa molécula também seria benéfica para reduzir a quantidade livre desse segundo mensageiro. Informações detalhadas já descrevem bem o envolvimento dos NOS com o tecido prostático (Hedlund, 2005; Andersson, 2007; Andersson, Uckert *et al.*, 2007). Assume-se que na próstata humana a eNOS

está relacionada com a manutenção da perfusão vascular local, enquanto que a nNOS está mais envolvida no controle do tônus do músculo liso e da função glandular, incluindo a proliferação de células epiteliais e subepiteliais (Kedia, Uckert *et al.*, 2008). Também, altos níveis de expressão de NOS já foram encontrados em diversos tipos de tumores malignos como de estômago, tireoide, mama, pulmão, colón, bexiga, cérebro, melanoma e próstata (Lala e Orucevic, 1998; Fukumura, Kashiwagi *et al.*, 2006; Zhu, Li *et al.*, 2011), assim também como em processos inflamatórios (Salvemini, Kim *et al.*, 2013).

O que torna todos esses dados ainda mais controversos são as descobertas citadas anteriormente a respeito da interatividade do chá verde e o PDE-5i. Ambos os grupos demonstram que o composto do chá verde conhecido como EGCG (*epigallocatechin gallate*), consegue ativar a via do receptor 67LR. Para um dos grupos, este receptor é capaz de ligar e inibir a produção das MAPKs e MMPs (*matrix metalloproteinases*), causar alterações nos receptores IGF-1R e EGFR e outras atividades as quais inibem o desenvolvimento do câncer e induzem a apoptose (Yang e Wang, 2013). Todavia, o resultado do segundo grupo, através de experimentos, concluiu que o receptor 67RL possui a capacidade de aumentar a atividade da Akt quinase (AKT/PKB) (Kumazoe, Sugihara *et al.*, 2013). Esse aumento na atividade da Akt quinase ativa a produção de NO através da eNOS e nNOS (El-Mas, Fan *et al.*, 2009; Patruno, Franceschelli *et al.*, 2012; Yao, Natarajan *et al.*, 2012), tornando assim o ambiente intracelular tóxico devido aos altos níveis de cGMP e NO e, por conseguinte, induzindo à apoptose (Kumazoe, Sugihara *et al.*, 2013). É interessante relatar que, a partir dos dados disponíveis no banco de dados do *ArrayExpress* sob número de acesso E-GEOD-6919 (Figura 10) (Institute, 2013), o tecido com CP demonstra possuir um fenótipo com as mesmas características das induzidas pelo tratamento com PDE-5i e chá verde (baixa expressão de PDE5 e alta de nNOS) (Chandran, Ma *et al.*, 2007).

Figura 10 - Comparação de expressão do PDE5A e nNOS em tecido prostático.



Nota: Os números representam o valor de  $p$  ( $\chi^2$ ).

Fonte: Imagem retirada do banco de dados do ArrayExpress sob número de acesso E-GEOD-6919 (Institute, 2013).

Um outro estudo realizou a simples aplicação de NO e reguladores de cGMP (como as PDE-5i) em vários tipos de linhagens celulares e modelos animais, e obteve resultados controversos a respeito de que se a via poderia ser ou não benéfica ao câncer (Bian, Ghassemi *et al.*, 2012). Acredita-se que a via dependente de NO/cGMP pode variar de tecido para tecido e também depende dos tipos dos diferentes tumores (Bian, Ghassemi *et al.*, 2012). Dessa forma, ainda não é possível afirmar se esta via é benéfica ou prejudicial ao câncer (Kimura e Murad, 1975; Mujoo, Sharin *et al.*, 2010; Bian, Ghassemi *et al.*, 2012). Necessita-se que exista um maior conhecimento da funcionalidade desta PDE em todos os tecidos antes da sua opção como forma de tratamento ao câncer (Faucz, Bertollo De Alexandre *et al.*, 2011).

#### 1.4.2.6 PDE6

A família da PDE6 é composta principalmente por 3 isoenzimas: PDE6A, PDE6B e PDE6C. No entanto, se diferencia das demais famílias das PDEs por possuir outros três membros (PDE6D, PDE6G e PDE6H) os quais não desempenham um papel típico de fosfodiesterase.

Similarmente à PDE5, essa família é constituída por membros que contêm uma especificidade por cGMP e também possuem 2 domínios GAF responsáveis por regular a atividade catalítica da enzima (Zhang, Cahill *et al.*, 2008) (Figura 5F). As PDE6 também são afetadas, em menor escala, pelos PDE-5i, o que justifica alguns dos poucos efeitos colaterais encontrados por essas drogas (Bischoff, 2004; Kerr e Danesh-Meyer, 2009). Mas ao contrário

da PDE discutida no item anterior, essa família possui a sua expressão quase que limitada aos fotorreceptores dos segmentos exteriores da retina dos mamíferos (Miki, Baraban *et al.*, 1975; Ridge, Abdulaev *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, as PDE6G, 6H e 6D não desempenham o papel tradicional das PDEs. Enquanto as PDEs 6G e 6H são conhecidas por ter uma função de inibição das PDEs 6A, 6B e 6C (Tuteja, Danciger *et al.*, 1990; Shimizu-Matsumoto, Itoh *et al.*, 1996; Stryer, 1996; Piri, Gao *et al.*, 2005), a função da PDE6D ainda não é bem conhecida (Dekomien e Epplen, 2003), mas acredita-se que o seu funcionamento está relacionado com a dissociação de GTP (Linari, Hanzal-Bayer *et al.*, 1999).

Atualmente, essa família está muito ligada a doenças visuais como, em algumas formas de cegueira noturna (Muradov, Granovsky *et al.*, 2003) e retinite pigmentosa (Mclaughlin, Sandberg *et al.*, 1993; Dryja, Rucinski *et al.*, 1999). A expressão e caracterização de PDE6 em outros órgãos tem recebido pouca atenção (Nikolova, Guenther *et al.*, 2010), muito embora existam relatos de expressão desses genes na próstata e em outros tecidos (Su, Wiltshire *et al.*, 2004; Liu, Ramachandran *et al.*, 2006; Lukk, Kapushesky *et al.*, 2010). Trabalhos recentes sugerem que a sua funcionalidade vai além da cascata de fototransdução clássica. Acredita-se que fora do tecido da retina essas enzimas possuem a capacidade de sinalizar pela via Wnt (Wang, Lee *et al.*, 2004; Ma e Wang, 2007). A via Wnt já foi associada a diversos tipos de carcinomas inclusive o da próstata (Hsieh, Chang *et al.*, 2013; Johnson, Price *et al.*, 2013).

#### 1.4.2.7 PDE7

Esta família é constituída por apenas 2 membros, os quais não compartilham nenhuma das propriedades dos outros membros da cAMP-específicos (Michaeli, Bloom *et al.*, 1993) e nem mesmo outro domínio reconhecido como o GAF (Figura 5G).

O conhecimento sobre essa família ainda é muito limitado, principalmente no que se diz respeito a PDE7B (Lugnier, 2006; Ke e Wang, 2007). No entanto, a família tem se mostrado essencial para o crescimento de células de leucemia *in vitro* (Zhang, Murray *et al.*, 2008). O gene da *PDE7A* está distribuído ubiquamente nas células pró-inflamatórias e imunes (Smith, Brookes-Fazakerley *et al.*, 2003), músculo esquelético, corpos cavernosos e próstata (Wheeler, Ayyagari *et al.*, 2005). Enquanto a expressão de *PDE7B* é maior no pâncreas seguido de

cérebro, coração, tireoide, músculo esquelético, olho, ovário, glândula submaxilar, epidídimo e do fígado, a sua expressão na próstata é mínima ou ausente (Gardner, Robas *et al.*, 2000; Hetman, Soderling *et al.*, 2000).

Aparentemente, a PDE7A mostra-se necessária para a ativação de células T induzida pela co-estimulação dos receptores CD28 e CD3, uma vez que aumentou a PDE7 correlacionada com uma diminuição no cAMP, aumento da interleucina-2 e uma maior proliferação (Li, Yee *et al.*, 1999; Glavas, Ostenson *et al.*, 2001). Acredita-se também que essa PDE esteja relacionada com capacidade de hidrolisar e excretar testosterona nas células (Ekstrom, Schulze *et al.*, 2011).

Recentemente foi descoberta a existência da relação entre alterações genéticas no gene da PDE7A e a capacidade de reconhecimento de seu inibidor (Huai, Wang *et al.*, 2003), sugerindo que um mesmo princípio também possa ser aplicado para as demais famílias e seus respectivos genes. O entendimento dessas variabilidades genéticas será essencial para entender como, quando e quais medicamentos podem ou não ser utilizados para o tratamento de doenças.

#### 1.4.2.8 PDE8

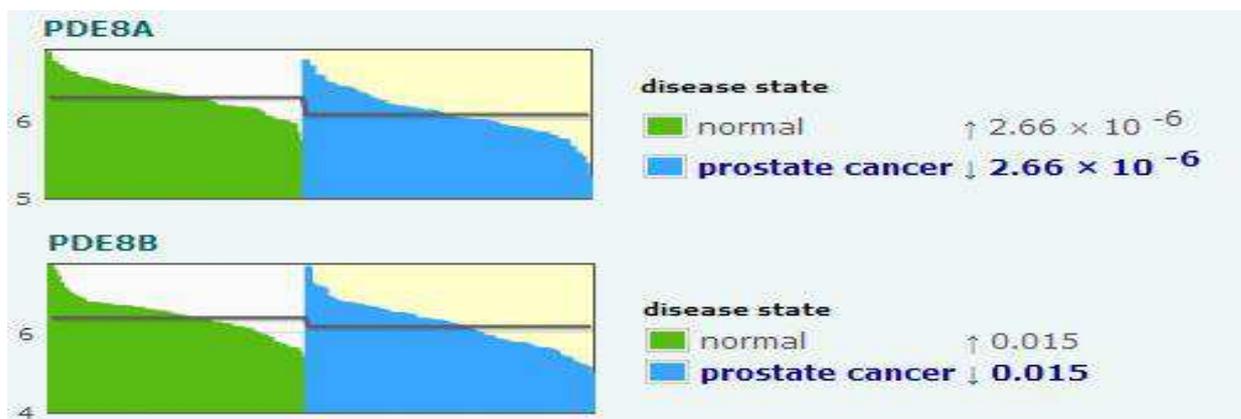
Ao contrário das demais famílias, as PDEs-8 possuem 2 domínios diferentes chamados REC (do inglês: *receiver*) e PAS (do inglês: *period circadian protein; aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein; single-minded protein*) não encontrados em nenhuma outra PDE (Figura 5H). As funções desses domínios dentro dessas PDEs ainda não estão bem esclarecidas (Kobayashi, Gamanuma *et al.*, 2003; Gilles-Gonzalez e Gonzalez, 2004). Sabe-se que muitos dos domínios REC e PAS estão presentes em proteínas do tipo sensitivas. O domínio REC está presente em sistemas de transdução de sinal que permitem sentir, responder e se adaptar a uma ampla gama de ambientes estressores e condições de crescimento (Skerker, Prasol *et al.*, 2005). Nas PDEs acredita-se que esse domínio está relacionado com a atividade hidrolítica (Kobayashi, Gamanuma *et al.*, 2003). Enquanto o domínio do tipo PAS demonstrou responsável por se ligar a cofatores ou ligantes, sendo essenciais para a detecção de sinais sensoriais de entrada como de fosfatos, oxigênio, redox ou a luz (Hefti, Francoijs *et al.*, 2004).

O funcionamento intracelular dessa família é semelhante com alguma das outras famílias das PDEs. Assim como a PDE5, possui capacidade de hidrolisar cAMP, causando a

despolarização de membrana e afetando os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Patrucco, Albergine *et al.*, 2010). Do mesmo modo que aparenta estar relacionada com a regulação da ativação das células T (Dong, Osmanova *et al.*, 2006), a regulação da modulação de testosterona (Vasta, Shimizu-Albergine *et al.*, 2006) afeta a produção de T4 e T3 na tireoide (Arnaud-Lopez, Usala *et al.*, 2008). Distribuído de forma abundante em vários tecidos como na próstata (Wheeler, Ayyagari *et al.*, 2005) e nos testículos (Wang, Wu *et al.*, 2001; Hayashi, Shimada *et al.*, 2002).

Os dados disponíveis no *ArrayExpress*, sob número de acesso E-GEOD-6919 (Figura 11) (Institute, 2013), relatam que foi encontrada uma diminuição nos níveis expressão dos genes *PDE8A* e *PDE8B* entre tecido normal e o tecido com CP metastático (Chandran, Ma *et al.*, 2007). Essa redução significativa encontrada, assim como visto na *PDE4*, pode significar uma maior quantidade de cAMP livre na célula e, conseqüentemente, um pior prognóstico da doença.

Figura 11 - Comparação de expressão dos genes *PDE8* em tecido prostático.



Nota: Os números representam o valor de  $p$  ( $\chi^2$ ).

Fonte: Imagem retirada do banco de dados do *ArrayExpress* sob número de acesso E-GEOD-6919 (Institute, 2013).

#### 1.4.2.9 PDE9

Dentre as PDEs com a capacidade de hidrolisar cGMP, a *PDE9A* é a que possui uma maior afinidade por esse segundo mensageiro (Fisher, Smith *et al.*, 1998) e, interessantemente, não possui nenhum tipo de domínio conhecido para auxiliar nessa função (Figura 5I) (Huai, Wang *et al.*, 2004). Devido ao grande número de transcritos a sua expressão é encontrada de

forma ubíqua (Rentero, Monfort *et al.*, 2003), porém como poucos realmente chegam a ser traduzidos, ainda não se sabe exatamente em quais tecidos está expressa. No entanto já existe relato de sua existência em tecido como da próstata (Wheeler, Ayyagari *et al.*, 2005; Nagasaki, Nakano *et al.*, 2012), cérebro, rim, baço, cólon e intestino (Wunder, Tersteegen *et al.*, 2005).

A utilização dos inibidores específicos de cGMP, como PDE-5i, não demonstraram uma eficiência muito grande na inibição da PDE9A (Wunder, Tersteegen *et al.*, 2005), provavelmente devido ao fato de possuir um domínio catalítico que se assemelha mais a da PDE4 (Huai, Wang *et al.*, 2004). Sabe-se também que o principal inibidor desta PDE não é seletivo, pois causa também a inibição da PDE1B e conseqüentemente gera o aparecimento de alguns efeitos colaterais (Meng, Hou *et al.*, 2012).

Apesar dessa diferença entre as regiões catalíticas de PDE5 e PDE9, acredita-se que ambas possuem uma função similar, já que a utilização de PDE-9i, juntamente com a PDE-5i, auxilia no relaxamento dos corpos cavernosos do pênis pela via de cGMP/Ca<sup>2+</sup>/NO (Da Silva, Pereira *et al.*, 2013). Outrossim, aparentemente a inibição de PDE9 também pode induzir apoptose pelo acúmulo de cGMP em células cancerígenas de mama. Neste mesmo estudo, verificou-se um aumento significativo da quantidade de *PDE5A* e *PDE9A* expresso na mama (Karami-Tehrani, Moeinifard *et al.*, 2012). É interessante ressaltar que esse fenótipo de aumento na quantidade do *PDE5A* é o oposto daquele visto em próstata anteriormente (Chandran, Ma *et al.*, 2007). Porém, consultando os níveis de *PDE9A* nos dados disponíveis no *ArrayExpress* sob número de acesso E-GEOD-6919 (Figura 12) (Institute, 2013), também observa-se um aumento significativo da sua expressão (Chandran, Ma *et al.*, 2007).

Figura 12 - Comparação de expressão do PDE9A em tecido prostático.



Nota: Os números representam o valor de p ( $\chi^2$ ).

Fonte: Imagem retirada do banco de dados do ArrayExpress sob número de acesso E-GEOD-6919 (Institute, 2013).

#### 1.4.2.10 PDE10

Consiste em uma família de apenas um gene: o *PDE10A*. É expresso principalmente no cérebro, cerebelo, tálamo, hipocampo e na coluna vertebral (Fujishige, Kotera *et al.*, 1999; Seeger, Bartlett *et al.*, 2003), assim como nos testículos, especialmente nos espermatozoides em desenvolvimento (Fujishige, Kotera *et al.*, 1999), próstata (Wheeler, Ayyagari *et al.*, 2005) e também é detectável no pulmão, coração, rim e com níveis baixos em outros tecidos periféricos (Lakics, Karran *et al.*, 2010). Em sua sequência é possível encontrar a correspondência para dois domínios GAF, assim como os encontrados na PDE3 (Figura 5j) (Gross-Langenhoff, Hofbauer *et al.*, 2006). Apesar disso, os seus domínios GAF, assim como na PDE11A, não possuem capacidade de estimular o domínio catalítico (Matthiesen e Nielsen, 2009). Além disso, é interessante notar que o segundo domínio GAF (GAF-B) consegue se ligar apenas com o segundo mensageiro cAMP (Handa, Mizohata *et al.*, 2008). Como consequência dessa ligação, ocorre inibição da capacidade da enzima de hidrolisar seu alvo específico (cGMP) (Fujishige, Kotera *et al.*, 2000).

Atualmente, a principal utilização clínica de inibidores de PDE10A é o possível tratamento de distúrbios psiquiátricos (Rodefer, Murphy *et al.*, 2005), da esquizofrenia e de distúrbios cognitivos (Yang, Smotryski *et al.*, 2012; Reneerkens, Rutten *et al.*, 2013), e da doença neurodegenerativa progressiva de Huntington (Hu, Mccaw *et al.*, 2004). Até o momento existem apenas indícios de que PDE-10i pode auxiliar no controle de processo inflamatórios no cérebro (Oliva, Kang *et al.*, 2012) e, fora isso, não existe nenhum tipo de publicação relacionando essa enzima com qualquer tipo de câncer. Não foi encontrada significância na alteração da expressão entre o tecido normal e o CP no bancos de dados do *ArrayExpress* (Institute, 2013). Contudo, a PDE10A e a PDE11A são os membros mais novos descobertos dentre as PDEs (Jager, Russwurm *et al.*, 2012) e o conhecimento dos seus possíveis usos ainda estão sendo pesquisados.

#### 1.4.2.11 PDE11

A PDE11A é a única componente desta família que possui a capacidade de hidrolisar cGMP e cAMP na mesma quantidade, porém o seu sítio catalítico aparenta ter uma maior similaridade com a da PDE5A (Fawcett, Baxendale *et al.*, 2000). Assim como na PDE10A, não

se conhece a exata função de seus dois domínios do tipo GAF, mas sabe-se que não existe relação com a atividade do domínio catalítico (Matthiesen e Nielsen, 2009). É interessante notar que nem todas suas isoformas possuem a sequência para os dois domínios do tipo GAF (Yuasa, Kotera *et al.*, 2000; Yuasa, Kanoh *et al.*, 2001).

Apesar de ter sido detectada uma expressão do RNAm em diversos tecidos, a proteína apenas foi detectada no tecidos da próstata, coração, fígado, glândula pituitária (Loughney, Taylor *et al.*, 2005), adrenal e testículos (Horvath, Boikos *et al.*, 2006; Horvath, Korde *et al.*, 2009). Atualmente é a PDE mais relacionada com a carcinogênese, sendo que quase todos os estudos que a relacionam com doenças encontram variações inativadoras na sua sequência de DNA (Horvath, Boikos *et al.*, 2006; Boikos, Horvath *et al.*, 2008; Libe, Fratticci *et al.*, 2008; Horvath, Korde *et al.*, 2009; Faucz, Horvath *et al.*, 2011; Vezzosi, Libe *et al.*, 2012).

Em um estudo, a frequência de variantes inativadoras na sequência de *PDE11A* foi encontrada em uma quantidade significativamente maior entre os pacientes com tumor familiar bilateral nas células germinativas do testículo (Horvath, Korde *et al.*, 2009).

Já foi demonstrado anteriormente que cerca de 30% do DNA de tecido prostático de pacientes com CP apresentam alterações genéticas, incluindo mutações que levam a um códon de parada prematuro (Faucz, Horvath *et al.*, 2011). Outro tópico que vale a pena ressaltar sobre esse artigo é que os autores sugerem que uma inativação prolongada dessa PDE, ou seja, a utilização indiscriminada de inibidores de PDE11 (PDE-11i), também poderia levar ao fenótipo de CP (Faucz, Horvath *et al.*, 2011). Esse foi o primeiro e único estudo até o momento relacionando qualquer tipo de variações genéticas de qualquer uma das PDEs com a doença.

## 1.5 JUSTIFICATIVA

As fosfodiesterases são essenciais para o funcionamento correto dos organismos. (Halpin, 2008). Devido composição de cada uma dessas proteínas, já foram desenvolvidos medicamentos capazes de inibir quase todas, individualmente. Essa fácil manipulação da atividade das PDEs e o seu potencial de utilização tem trazido muita atenção à comunidade científica (Andersson, Uckert *et al.*, 2007; Kerr e Danesh-Meyer, 2009; Faucz, Bertollo De Alexandre *et al.*, 2011; Page e Spina, 2011; Jin, Ding *et al.*, 2012; Yang, Smotryski *et al.*, 2012; Chavez, Scott Coffield *et al.*, 2013). Ainda mais, cientistas de todo o mundo encontraram

mutações inativadoras e alterações dos níveis de expressão associando-as a diversas doenças (Li, Yee *et al.*, 1999; Dekomien e Epplen, 2003; Wang, Lee *et al.*, 2004; Horvath, Boikos *et al.*, 2006; Faucz, Horvath *et al.*, 2011). As possíveis vias pelas quais cada uma dessas PDEs podem ativar nos diferentes tecidos nem sempre são as mesmas e podem até divergir em diferentes estágios dos diferentes tipos de cânceres (Bian, Ghassemi *et al.*, 2012).

Diferentes mutações não só podem afetar a capacidade de inibição das drogas (Huai, Wang *et al.*, 2003), como também podem influenciar no aparecimento de cânceres e dos seus diferentes tipos em diferentes tecidos (Libe, Fratticci *et al.*, 2008; Faucz, Horvath *et al.*, 2011; Vezzosi, Libe *et al.*, 2012). Então, antes desses medicamentos começarem a ser comercializados para o tratamento de neoplasias, deve-se compreender como cada uma das PDEs interagem nos diversos tipos de cânceres.

Visto esta importância, é fundamental entender a relação dos genes *PRKARIA* e a família de genes das fosfodiesterases com o câncer de próstata, buscando mais e melhores informações a fim de se tentar encontrar características relacionadas com as estimativas de risco de recorrência, diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento desta doença.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a variabilidade genética das fosfodiesterases e a principal subunidade regulatória da PKA com uma maior predisposição ao câncer de próstata, utilizando pacientes com o tipo esporádico da doença.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e confirmar, em todo o conjunto amostral de pacientes, por sequenciamento do tipo Sanger, todas as variantes exônicas e próximas aos éxons encontradas por SOLiD nos genes *PRKARIA* e *PDE5A*;

- Analisar somente através dos dados obtidos pela plataforma SOLiD 4, a variabilidade genética existente entre todos os éxons dos genes da família das fosfodiesterases nos pacientes submetidos a essa técnica;

- Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos e mutações dos genes *PRKARIA* e *PDE5A* com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer;

- Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos e mutações dos demais genes da família das PDEs com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de tecido de câncer de próstata de pacientes foram obtidas no hospital AC Camargo (São Paulo), sendo que o material foi separado no momento da cirurgia de prostatectomia radical e armazenado inicialmente nas seguintes etapas: A) Armazenamento Primário e após o B) Armazenamento Definitivo.

A) Armazenamento primário: é aquele que ocorre imediatamente após a obtenção das amostras que então são colocadas em tubos criogênicos de 2,0 mL, identificados com seus respectivos registros e imediatamente armazenados na caixa plástica. Consecutivamente, essa caixa é levada ao freezer de ultrabaixa temperatura (80° Celsius negativos).

B) Armazenamento definitivo: ocorre quando os tubos da caixa plástica são retirados e armazenados em caixas de papelão em um tambor de nitrogênio líquido, onde as amostras foram mantidas até sua utilização.

Para o diagnóstico e pontuação, os tumores foram fixados em formalina e mergulhados em parafina, cortados em seções de 4µm e corados com hematoxilina e eosina. Dessa forma foi possível separar o material afetado pelo câncer do tecido normal.

Foram coletadas amostras de tecido prostático de 50 indivíduos afetados por CP. Desses, 49 indivíduos possuíam CP esporádico, e apenas 1 é do tipo familiar. A idade média desses pacientes foi de 67 anos (de 48 a 79 anos). Seis desses indivíduos possuíam o valor de PSA abaixo do considerado normal para sua etnia e faixa etária (Polascik, Oesterling *et al.*, 1999). Apenas dois não possuíam dados suficientes para obter as informações necessárias para essa verificação (Tabela 3). Essas amostras foram comparadas com controles neutros adquiridos do projeto *1000 Genome*. Esse projeto consiste no sequenciamento genômico de uma amostra da população mundial contendo 1092 indivíduos separados por suas origens, sendo que entre esses 379 são de origem europeia.

Tabela 3 - Características individuais de cada paciente.

Amostra*	Idade	Histórico Familiar	Pontuação Gleason	PSA anterior**	Último PSA**	Estágio
01DT	64	0	6	7.89	0.040	pT2b
02DT	56	0	6	8.30	0.020	pT3a
03DT	61	0	8	9.20	0.079	pT2b
04DT	61	0	8	5.00	0.010	pT3a
05DT	67	0	6	9.50	0.100	pT2b
06DT	66	0	6	13.80	0.007	-
07DT	56	0	6	10.60	0.050	pT3a
08DT	61	0	6	4.20	0.169	pT3b
09DT	64	0	6	5.70	0.050	pT3b
10DT	78	0	6	-	-	pT2a
11DT	71	0	6	8.95	0.010	pT3a
12DT	56	0	7	21.90	0.300	pT2b
13DT	50	1	7	18.16	3500	pT2b
14DT	57	0	7	4.60	0.030	pT2b
15DT	72	0	7	7.32	0.040	pT4a
16DT	64	0	7	25.90	0.010	pT3a
17DT	77	0	7	7.20	0.110	pT2b
18DT	58	1	7	2.40	0.075	pT2b
19DT	69	0	7	20.30	0.010	pT2b
20DT	55	0	7	14.00	0.918	pT2b
21DT	48	0	7	7.60	0.050	pT2a
22DT	62	0	7	5.74	0.050	pT3a
23DT	58	1	7	8.60	0.062	pT3a
24DT	61	0	7	17.80	0.030	pT3a
25DT	54	0	7	7.30	0.050	pT3a
26DT	60	0	7	4.22	0.010	pT3a
27DT	64	1	7	7.50	0.008	pT3a
28DT	71	0	7	7.10	0.179	pT3a
29DT	65	0	7	16.50	0.080	pT3a
30DT	62	0	7	5.11	0.040	pT2a
31DT	55	0	7	22.10	0.003	pT2b
32DT	72	0	7	6.80	0.053	pT3a
33DT	60	0	7	5.20	0.019	pT3b
34DT	61	0	7	5.70	0.020	pT3a
35DT	79	0	7	8.63	0.100	pT2b
36DT	62	0	7	20.28	0.320	pT2b
37DT	73	2	7	21.87	0.040	pT3a
38DT	60	0	7	32.05	0.310	pT2b
39DT	68	0	7	6.21	0.060	pT3a
40DT	-	0	7	-	-	pT4a
41DT	74	0	7	5.25	0.020	pT3a
42DT	65	0	7	13.94	0.586	pT2b
43DT	64	0	7	9.20	0.090	pT2b
44DT	56	0	7	9.60	0.085	pT3b
45DT	70	0	7	10.30	0.008	pT2a
46DT	66	0	7	33.61	0.170	pT3a
47DT	63	0	7	3.93	0.010	-
48DT	67	0	7	23.30	0.070	-
49DT	74	0	7	6.30	0.003	-
50DT	63	0	7	7.60	0.003	-

Nota: \*Amostras renomeadas em códigos. \*\*Valores de PSA pré e pós-operatório. 0 histórico familiar ausente. 1 e 2 no histórico familiar refere-se ao número de indivíduos na família com a doença. – refere-se a valores indisponíveis ao pesquisador.

A extração de DNA foi feita através do kit de extração de DNA *MagMAX™ FFPE DNA Isolation Kit* (número de catálogo 4463578), através do protocolo do produto disponível pela empresa *Invitrogen™*, fornecido pela empresa *Life Technologies Corporation*. No entanto, as amostras DT50 e DT49 não possuíam uma qualidade de DNA adequada para à pesquisa. Devido a isto, o projeto foi desenvolvido com um total de 48 amostras.

Todos os pacientes antes de fornecer o material biológico, leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR através do protocolo número nº 001278/07 CEP-PUCPR.

### 3.2 AMPLIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO DE ÚLTIMA GERAÇÃO (NGS)

Dezesseis das 48 amostras foram selecionadas por possuírem um DNA de melhor qualidade para serem sequenciadas no equipamento SOLiD™ 4 System da empresa Life Technologies. As amostras selecionadas foram as DT01, DT02, DT03, DT04, DT07, DT08, DT10, DT12, DT18, DT19, DT21, DT22, DT32, DT35, DT38 e DT45. Devido a grande quantidade de DNA requerida pelo sistema e a pouca quantidade de DNA disponibilizada pela equipe do hospital A.C. Camargo, a priori, as amostras tiveram que passar pelo processo de Amplificação do genoma inteiro (WGA do inglês *Whole Genome Amplification*) através do kit de reagentes *REPLI-g Mini Kit*, com o protocolo fornecido pela empresa QIAGEN. Este é um método simples capaz de reamplificar o genoma em grande quantidade sem qualquer purificação adicional. Em contraste com a tecnologia de PCR convencional, a técnica WGA possui um menor índice de erro devido ao fato de que as taxas de fidelidade de amplificação da enzima polimerase são aumentadas em até 1000 vezes. Após a obtenção da quantidade de DNA necessária, as amostras começaram a ser preparadas para a etapa de NGS.

Para a análise da amostra através do procedimento NGS foi utilizado um protocolo criado pelo laboratório *Molecular Genetics Laboratory (MGL)* no *National Institute of Child Health and Human Development (NICHD)* e adaptado para as necessidades deste trabalho (Anexo 1). Devido à extensão do protocolo, cujo tempo para a realização de 8 amostras é de uma a duas semanas, uma versão resumida é apresentada no corpo do texto.

Os DNAs são inicialmente quantificados através do equipamento *Qubit dsDNA BR Assay*, e a sua qualidade é medida através do espectrofotômetro *NanoDrop 2000c Thermo Fisher Scientific* (não degradado, A260/A280 entre 1,8 e 2,0) para que as análises possam apresentar uma boa confiabilidade e para que seja reduzido o número de eventuais repetições. Três microgramas do DNA genômico são diluídos em 100µL de 1X *LOW TE Buffer* em um tubo *Low Bind* de 1,5mL. Em seguida o material é fragmentado através do instrumento *Covaris* para que o DNA a ser sequenciado tivesse um tamanho entre 150 a 180 pb. A visualização do resultado desta fragmentação é realizada através do equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*, o qual deve demonstrar uma distribuição de picos entre 50 a 500 pb para garantir uma boa fragmentação. As extremidades são então reparadas com a enzima de polimento das extremidades e o material começa a ser purificado por *AMPure Beads* (Esferas magnéticas ionizadas) em uma estante magnética. O passo seguinte é a ligação dos adaptadores P1 e P2

através de incubação em temperatura ambiente por 15 minutos. Com as amostras purificadas e preparadas, é realizada uma PCR com mix específico para amplificação das bibliotecas previamente selecionadas. Esta etapa é seguida por uma verificação da distribuição do tamanho dos fragmentos com a utilização do *Agilent 2100 Bioanalyzer*, no qual deve ser observado um pico em torno de 220 a 250pb. São separados 500 ng do DNA amplificado que para serem concentrados em um volume final de 3,4  $\mu\text{L}$  (147 ng/ $\mu\text{L}$ ), e assim misturados com a biblioteca de RNA chamada de iscas, que são específicas para os 194 genes selecionados para o sequenciamento por *Agilent's SureSelect Target Enrichment System* (Anexo 2) para hibridação a 65° C em um termociclador. Diretamente do termociclador é adicionado o *mix* de hibridação e a solução de esferas metálicas então a mistura é incubada a temperatura ambiente. Depois da incubação a solução é purificada com *AMPure Beads*, utilizando os tampões de lavagem apropriados com etanol a 70%. Ocorrerá então a preparação da etapa de PCR pós-hibridação que ocorre através da amplificação pelo termociclador. Após esta amplificação, é realizada mais uma purificação com *AMPure Beads* seguido pela leitura da estimativa de distribuição do tamanho dos fragmentos com o *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Para essa leitura deve-se obter um pico em torno de 220 a 250 pb, e a após esse procedimento é estimado a quantidade de DNA através de uma PCR quantitativa (qPCR). O passo seguinte é o preparo do *mix* para a fase de óleo com *EZ Bead*, “*E-Small Pouch*” e o preparo dos *P1 Beads* no *SOLiD™ EZ Bead™ Emulsifier* para a PCR em emulsão no *SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier*. A amostra é armazenada em 4°C até ser realizada a etapa de enriquecimento das esferas. Essas esferas são então contadas através do espectrofotômetro *NanoDrop®* e a sua concentração é acertada para a 750.000 até  $1,25 \times 10^6$  esferas/ $\mu\text{L}$ . As esferas são então depositadas na lâmina e os reagentes e os acessórios serão adicionados na máquina de sequenciamento e o NGS será iniciado.

Após a corrida realizada pelo equipamento *SOLiD 4*, os dados são enviados ao corpo de bioinformática para serem lidos através da plataforma Linux e convertidos para arquivos do tipo “.bam”. Esses arquivos são denominados “*Bone Files*” e são posteriormente interpretados pelos programas *Bioscope* e/ou *GATK* e convertidos a uma planilha “.vcf”, acessível pelo Microsoft Excel para a realização da análise estatística e a verificação dos SNPs encontrados nos genes selecionados. Foram utilizados dois programas distintos para interpretação dos dados, devido ao fato de que, por experiência nos resultados gerados por ensaios passados, foi possível ver uma divergência nos resultados emitidos por ambos os programas. Desta forma, os resultados dos dados brutos dos arquivos “.vcf” gerados tanto por *Bioscope* quanto por *GATK*, foram agrupados em um único arquivo e os dados duplicados foram excluídos. Com relação a

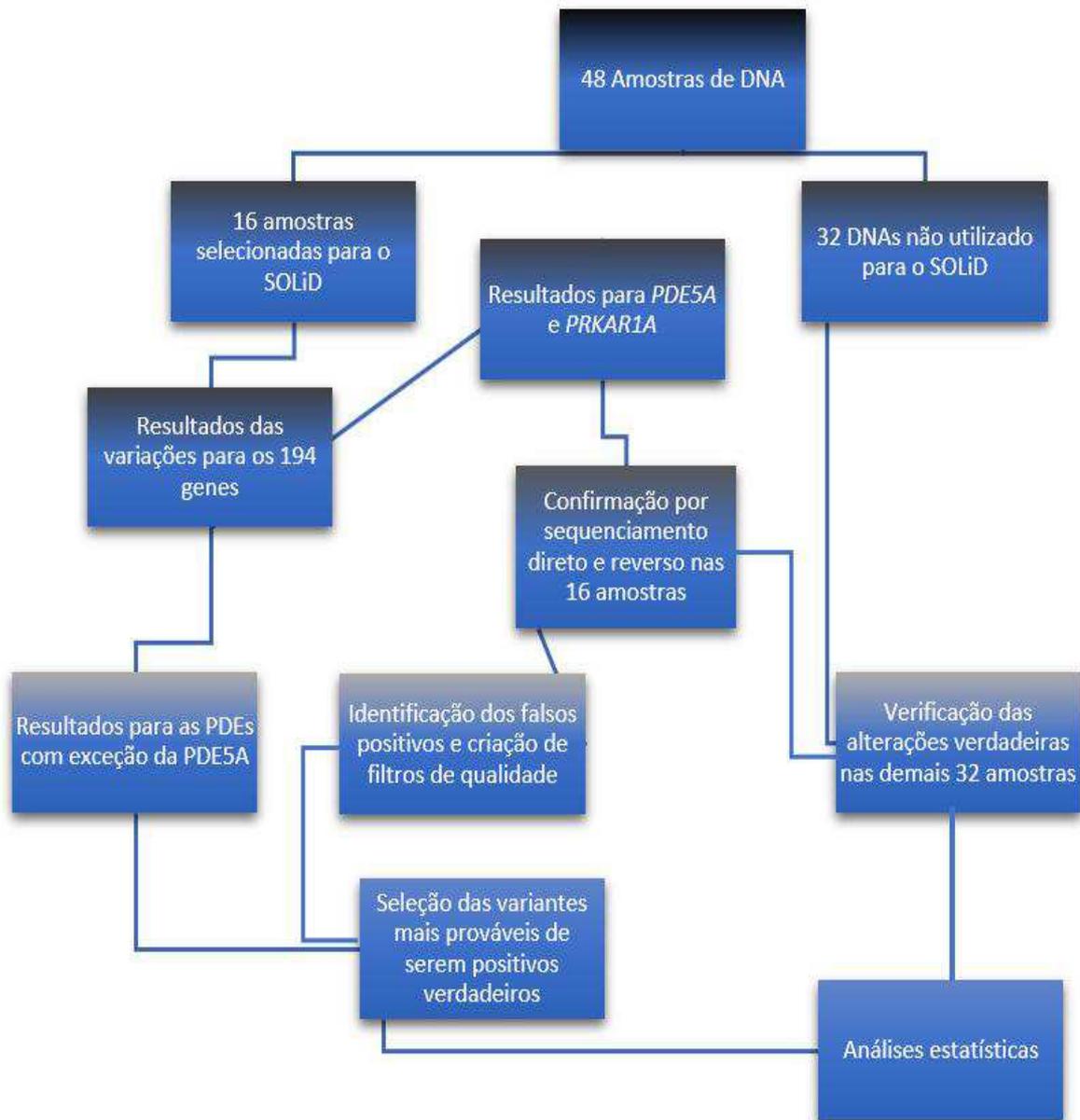
análise dos genes da família das PDEs e *PRKARIA*, todos os filtros de qualidade foram retirados. Logo, qualquer mutação do tipo somática encontrada em tecido germinativo que estivesse em um menor número de células cancerígenas, também poderia ser detectada.

### 3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR) E SEQUENCIAMENTO POR SANGER

Todos os éxons dos genes *PRKARIA* e *PDE5A* encontrados com alterações genéticas através da técnica de NGS foram amplificados em todas as 48 amostras a partir da técnica de PCR convencional (Figura 13). Esta técnica se baseia na amplificação seletiva *in vitro* de regiões específicas de DNA, as quais são delimitadas por pares de iniciadores, através da adição da enzima *Taq* polimerase e ciclos de temperatura sucessivos capazes de causar: desnaturação da dupla fita, hibridação e extensão da molécula. Ao contrário da NGS, esta etapa apresenta uma vantagem considerável relacionada a uma menor necessidade na quantidade de DNA necessário, tempo dedicado e especificidade.

Foram então desenhados oligonucleotídeos iniciadores para o gene *PRKARIA* (éxons 2, 3, 4, 8 e 9) e para o gene *PDE5A* (éxons 2, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 17, 19, 20 e 21) (Tabela 4) através do programa “BatchPrimer3 v1.0” disponível em <http://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>. As condições para o desenvolvimento são as mesmas disponíveis como padrão no site, com exceção do tamanho do produto mínimo (250 pb), tamanho ideal (400 pb), tamanho máximo (600 pb) e quantidade de GC% máxima (60,0%). As condições utilizadas para as amplificações seguem de acordo com o otimizado pelo laboratório (Tabela 5).

Figura 13 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises com as 48 amostras.



Nota: Foram coletadas 48 amostras sendo que apenas 16 foram utilizadas na plataforma SOLiD 4. Dos resultados obtidos por essa plataforma, foram sequenciados por Sanger todas as variantes encontradas para os genes *PDE5A* e *PRKAR1A*. O resultado desse procedimento foi utilizado nos demais genes para filtrar os falsos positivos. Ainda mais, todos esses resultados também foram confirmados nas demais 32 amostras não utilizadas por SOLiD. Análises estatísticas foram feitas para todas as análises.

Fonte: o Autor.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores dos éxons dos genes *PRKARIA* e *PDE5A*.

Gene / Éxon	Primer Direto	Primer Reverso
PRKAR1A Ex2	CCTAGTCCCCACTTCCCTGT	ATCACCTCATCATCTCCCA
PRKAR1A Ex3	CATGCCGAAGGATCTCATTT	ATGGATGAAGTTCCACCCTG
PRKAR1A Ex4	CAGGTTGCAAACGTGAAATG	CTGCGATAAAGGAGACCGAA
PRKAR1A Ex8	GGCATAATATTGGCGGAAAA	AAGGCTTTTCCCAAGTCCAT
PRKAR1A Ex9	AGAATGTTGAATGGGCATGG	TTAGCCCCTCTTTCCCTCTT
PDE5A Ex2	GGAGCTCTCAGGCATAGCAC	TTCATGATTGCTATCCAATGC
PDE5A Ex4	AATGCTGATGAGGGGTTTTG	TCAGATGTGAAATCATCGCTTTA
PDE5A Ex7	GGGAAGCAGTTTTGAGGATG	GGAGGACGACTTAGGACCGTA
PDE5A Ex8	CGATGAGAATAAGGCCATTCA	CCTCAGATGAGGGAAAGCAC
PDE5A Ex9	GGCATCTAATGGACAAATCAATCTC	GTCAACATCCAGGAAATAGACTC
PDE5A Ex10	AGACAATCTTTGGGTGTGTTTG	TGAGGACACAATGACGGAAC
PDE5A Ex13	TGAATGCTTTGTAGTGTCTGGA	CAACGAAGTAGTTTTGCCAGAT
PDE5A Ex17	TCGAAAGCAAATGATAGAAGG	CCCTCTGGAGAAATCTGACC
PDE5A Ex19	AGAGAGCACGCTTTGGACAT	TGAACCCAAGAGTCTTTATTATGC
PDE5A Ex20	GTTGCAGTGAGCTGAGATGG	TTGAGGGTAACACTGGCACA
PDE5A Ex21	GAAATGAGTGTGGGATGTGG	TGGATGTTGTTGATCCTTTCAG

Nota: Ex refere-se à Éxon.

Tabela 5 - Protocolo utilizado para a PCR.

A) Reagentes		1 rxn	B) Temperatura			
			Tempo	Ciclos	Delta T	
H <sub>2</sub> O		34,5	94 °C	2 min	Δ° C	
Tampão 10x		5	94 °C	30 seg	12 ciclos	-0.5°C
50 mM MgCl		2	64 °C	30 seg		
dNTPs (2,5 mM)		2	72 °C	45 seg	20 ciclos	
Pr1 (10 pMol)		2	94 °C	30 seg		
Pr2 (10 pMol)		2	58 °C	30 seg	1 ciclo	
DNA		2	72 °C	45 seg		
Taq (5μ/uL)		0,5	72 °C	3 min		
<b>Total Volume</b>		<b>50</b>				

Nota: A) Quantidade de reagentes em μL, utilizados para 1 reação (1 rxn) considerando as concentrações descritas de cada. B) Ciclos de temperatura padronizadas para todos os pares de iniciadores, sendo que, Delta T se refere a alteração de temperatura por ciclo passado.

Para controle da qualidade do amplificado, o produto de PCR foi aplicado em um gel de agarose a 1,5%. O gel foi submetido a uma voltagem de 120V por um período de 15 minutos. O gel era confeccionado com 3μL brometo de etídio para a sua coloração. Após a corrida, o gel foi levado a um foto documentador com emissão de luz UV. Para análise e confirmação do

tamanho do produto amplificado também foi aplicado ao gel 5 L de um marcador de peso molecular de 100 pb.

Após a confirmação das bandas, os produtos de PCRs foram purificados utilizando o reagente *USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup*. Esse reagente é capaz de purificar o amplificado, removendo iniciadores e nucleotídeos não utilizados sem perda de amostra. O processo de purificação consiste em 3 etapas: 1) Misturar 5 µL de produto de PCR com 2 µL de ExoSAP-IT; 2) Incubar esse produto a 37 °C por 15 minutos para degradar os iniciadores e nucleotídeos em excesso; e 3) Incubar a 80 °C por 15 minutos para inativar o reagente ExoSAP-IT.

O material amplificado e purificado foi utilizado para montar a reação de sequenciamento direto e reverso. Para essa reação foi utilizando o reagente *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* produzido pela *Applied Biosystems* e utilizado de acordo com as instruções fornecidas pelo fornecedor *Life Technologies* e otimizadas pelo laboratório (Tabela 6). Esse material então passou por um novo processo de purificação.

Tabela 6 - Protocolo utilizado para a reação de sequenciamento.

A) Reagentes	1 rxn	B) Temperatura	Tempo	Ciclos
H <sub>2</sub> O	3,5	96 °C	5 seg	
Tampão	2	96 °C	10 seg	] 25 ciclos
Primer (10 pMol)	0,5	50 °C	10 seg	
PCR (DNA)	2	60 °C	4 min	] 25 ciclos
BigDye 3.1	2	4 °C	(Contínuo)	
Total Volume	10			

Nota: A) Quantidade de reagentes em µL, utilizados para 1 reação (1 rxn) considerando as concentrações descritas de cada. B) Ciclos de temperatura padronizadas para todos os pares de iniciadores.

Essa segunda purificação foi desenvolvida pelos pesquisadores do laboratório MGL para agilizar e facilitar o processo pelo fato de utilizar completamente uma placa de 96 poços, e não tubos separadamente (Anexo 3). Esse processo começa com a adição de etanol 95% com acetato de sódio 3M com o produto da reação de sequenciamento. Esse material é então misturado e após centrifugado em uma centrifuga de placa por 45 min, e após é feita a inversão do conteúdo. Para eliminar o excesso dos reagentes na placa de 96 poços, esta é centrifugada

com a extremidade superior para baixo por 1 min. Após os poços secos é adicionado etanol 70%, seguido por uma nova centrifugação por 10 min, o excesso é descartado da mesma forma utilizada anteriormente e então o material é coberto em papel alumínio e armazenado em um freezer a -20 °C até a utilização.

Para finalizar o processo de sequenciamento, os produtos da reação de sequenciamento purificados são ressuspensos com 18 µL de formamida Hi-Di, produzido pela *Applied Biosystems* e fornecido pela *Life Technologies*. As placas foram então levadas ao sequenciador *Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. As sequências extraídas da máquina foram analisadas pelo programa *Lasergene SeqMan Pro 9.0* produzido pela empresa *DNASTAR* disponível no laboratório MGL.

### 3.3 BIOINFORMÁTICA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos pelo programa Bioscope e GATK foram agrupados, analisados e organizados pelos programas da Microsoft Excel e Access 2010 da Microsoft Office. Os dados foram complementados por informações disponíveis nos programas virtuais e bases de dados:

*SeattleSeq Annotation 137* (<http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation137/>) utilizado para identificar aminoácidos alterados, distância do spliceossomo, posição na proteína e no genoma;

*IGV* (<http://www.broadinstitute.org/igv/>) utilizado para visualizar os arquivos do tipo “.bam”;

*BioMart* (<http://www.ensembl.org/biomart/martview>) utilizado para fazer uma verificação genérica da frequência na população e identificar polimorfismos já descritos pelas bases de dados mais recentes;

*Ensemble* (<http://www.ensembl.org>) utilizado para verificação das sequências de pares de bases para a confecção dos primers e localização das alterações;

*1000 Genome* (<http://browser.1000genomes.org/index.html>) utilizado para a realização da comparação entre população controle e paciente;

*LS-SNP/PDB* (<http://ls-snp.icm.jhu.edu/ls-snp-pdb/>) utilização da verificação dos possíveis efeitos nas alterações na cadeia de aminoácido e estrutura da proteína;

*PolyPhen-2 (PPH)* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) utilizado para análise *in silico* das variação;

*SIFT* (<http://sift.jcvi.org/>) utilizado para análise *in silico* das variação; e

*IPA* (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>) utilizado para a verificação das vias metabólicas e em que tipos de tecidos cada gene está envolvido.

Cada um dos polimorfismos já descritos foram testados por meio de análise estatística no programa IBM SPSS software 20 (Figura 13). O método utilizado foi o teste exato de Fisher. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Também foi calculado o fator de risco OR (*odds ratio*), para cada uma das variantes.

#### 4. RESULTADOS

Foram sequenciadas duas placas, contendo 8 amostras em cada uma, no sistema de NGS SOLiD 4. Esse equipamento gerou uma média de 19 leituras de 50 bases por gene com uma média de 184 kilo bases (kb) por amostra (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de leituras por amostra

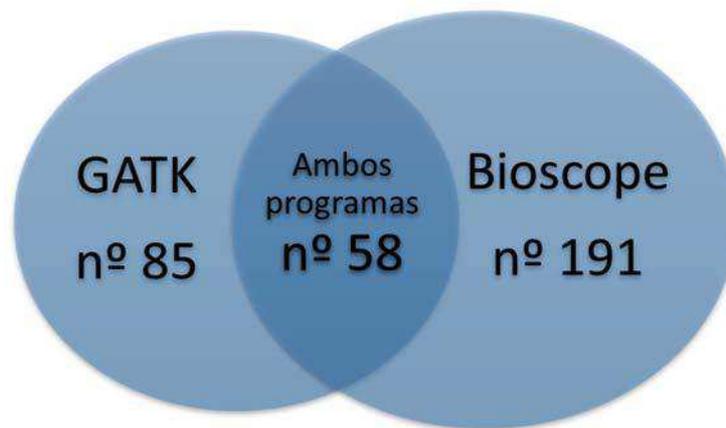
Amostra	Média de leituras por gene	Média de bases por gene	Nº de bases por amostra
DT1	18,77	938,5 kb	182084,5 kb
DT2	18,05	902,9 kb	175169,3 kb
DT3	18,99	949,5 kb	184217,1 kb
DT4	21,38	1069,1 kb	207413,9 kb
DT7	16,00	800,2 kb	155245,2 kb
DT8	18,77	938,8 kb	182142,7 kb
DT10	14,73	736,9 kb	142977,1 kb
DT12	19,35	967,7 kb	187744,3 kb
DT18	22,30	1115,2 kb	216363,1 kb
DT19	21,19	1059,9 kb	205628,1 kb
DT21	15,25	762,6 kb	147952,5 kb
DT22	22,37	1118,8 kb	217064,4 kb
DT32	21,60	1080,1 kb	209540,4 kb
DT35	19,68	984,3 kb	190963,9 kb
DT38	20,82	1041,4 kb	202040,0 kb
DT45	15,58	779,4 kb	151219,7 kb

Nota: DT refere-se à amostras com CP; kb refere-se a kilo bases

Para a seleção de polimorfismos foram excluídos todos os parâmetros referentes a qualidade e quantidade de leituras dos todos os dados emitidos pelo equipamento SOLiD 4, sendo que foram selecionados apenas as informações dos genes *PDE1A*, *PDE1B*, *PDE1C*, *PDE2A*, *PDE3A*, *PDE3B*, *PDE4A*, *PDE4B*, *PDE4C*, *PDE4D*, *PDE5A*, *PDE6A*, *PDE6B*, *PDE6C*, *PDE7A*, *PDE7B*, *PDE8A*, *PDE8B*, *PDE9A*, *PDE10A*, *PDE11A* e *PRKARIA*. Das alterações encontradas para estes genes foram mantidas todas as mutações novas e para os SNPs já descritos foram mantidos apenas as localizadas em éxons e em introns a até 15 pares de bases de éxons (Figura 13).

Através desse método foi possível selecionar 85 polimorfismos ou mutações para os genes *PDE5A* e *PRKARIA* pelo programa GATK, enquanto na utilização do Bioscope foi possível encontrar 191 alterações. Apenas 58 alterações foram encontradas em ambos os programas. O resultado total encontrado por ambos programas foi de 218 alterações genéticas únicas, sendo que foram encontrados 211 SNPs dentre os 21 genes das PDEs e apenas setepara o gene *PRKARIA* (Figura 14).

Figura 14 - Os 218 SNPs encontradas pelos dois programas distintos utilizados para detecção de variações do SOLiD.



Nota: nº refere-se a quantidade de SNPs encontrados em cada programa.

Fonte: o Autor.

Os sete SNPs encontrados para o gene *PRKARIA* através do SOLiD, eram mutações nunca antes descritas. Todos foram testados por sequenciamento direto e reverso em suas respectivas amostras. Apesar de terem sido identificados pelos programas não foram confirmados por sequenciamento convencional (Sanger) (Figura 13). A maior explicação para esse ocorrido é de que é comum encontrar falsos positivos nas plataformas de NGS quando não se leva em consideração os filtros de qualidade (Suzuki, Ono *et al.*, 2011). Isso pode ocorrer para alguns casos devido ao tamanho pequeno das leituras e possíveis ampliações de pseudogenes (Knies, Schuster *et al.*, 2012) e também devido a utilização prévia da técnica WGA causando ampliações errôneas em pequenas quantidades. No entanto, devido à tentativa de tentar encontrar quaisquer tipos de possíveis mutações somáticas a retirada dos filtros de qualidade pode ter agravado o aparecimento dos falsos positivos.

Entre as 211 alterações encontradas nas PDEs, apenas 16 foram referentes ao gene *PDE5A*. Seis dessas foram mutações novas identificadas por SOLiD porém, assim como para o gene anterior, não foi possível confirmar por sequenciamento e, por esse motivo, foram descartadas. Os outros 10 SNPs para *PDE5A* já haviam sido descritos na literatura e identificados pelo *1000 genome* (Figura 13) e foram confirmados por sequenciamento em seus respectivos pacientes. No entanto, entre esses 10 polimorfismos, apenas sete SNPs foram sequenciados em todos os pacientes remanescentes (Figura 13). Os outros três SNPs remanescentes não foram sequenciados em todos os indivíduos com CP por não demonstrarem significância estatística na amostra analisada e não aparentarem comprometer a estrutura da molécula (Tabela 8).

As demais mutações para os outros genes foram selecionadas manualmente, por meio da visualização das sequências através do programa IGV. Esse programa permite a visualização dos arquivos convertidos para a extensão “.bam”. Os parâmetros utilizados para separar os falsos positivos (aqueles não confirmados por Sanger) dos verdadeiros positivos (confirmados por Sanger) foram: qualidade, quantidade, direção e frequência das leituras; os quais foram baseados nos dados obtidos pelo sequenciamento dos genes *PDE5A* e *PRKARIA*. Através dessa seleção foram selecionados apenas 123 alterações as quais os atenderam os perfis de qualidade e aparentavam ser verdadeiros positivos (Figura 13). Dentre essas, apenas 17 aparentam ser mutações novas nunca descritas na literatura. Análises estatísticas foram feitas para os 106 SNPs referentes aos genes das PDEs ainda não analisados (Figura 13).

Outros genes como *PTENP1*, *PTEN*, *ARHGAP9*, *CDKL5*, *ATP7A* e *AR*, sequenciados por SOLiD, também foram submetidos às mesmas análises as quais passaram à família das PDEs. O intuito dessa análise foi de testar a homogeneidade de nossa população com os controles utilizados. Para esses genes foram encontradas 15 alterações, sendo que quatro dessas nunca foram descritas e serão confirmadas por sequenciamento direto no futuro. Os polimorfismos remanescentes não demonstraram significância estatística (Tabela 9).

Para a realização das análises estatísticas, quando em comparação com a população mundial, foram utilizados os 1092 indivíduos retirados dos bancos de dados do projeto *1000 Genome* de origem mista e de diferentes localizações do mundo (Apêndice 1). No entanto, a análise da comparação de nossos pacientes com indivíduos de origem europeia foram feitas a partir de dois bancos de dados. A grande maioria das análises foram feitas através dos dados disponíveis dos 379 indivíduos do projeto *1000 Genome* de origem europeia. Entretanto, para

alguns SNPs que cuja frequência não estava disponível nessa base de dado, foi-se utilizado os dados do *CLINSEQ\_SNP:CSAgilent* disponível no site Ensembl. Essa base de dados contém a informação de algumas variantes utilizando 4299 indivíduos de origem europeia (Apêndice 2).

Dentre as estatísticas realizadas, em relação a frequência alélica, foram encontrados 20 polimorfismos com significância estatística quando comparados os nossos pacientes com a população de origem europeia, e apenas seis polimorfismos demonstraram uma significância estatística para ambas populações descritas anteriormente (Tabela 9). No entanto, quando considerado as frequências genótípicas, 24 polimorfismos demonstraram significância entre pacientes e europeus, e oito foram significativos para ambas as populações. *Odds Ratio* foi considerado apenas para as frequências alélicas.

Dentre as fosfodiesterases com maior significância estatística se destacaram os genes das PDEs 11A, 2A e 1C, seguido pelos resultados dos PDEs 4B, 8A, e 6A. Análise *in silico* com o objetivo de analisar o potencial de abalar a estrutura da proteína foi realizada para todas as variantes através do programa PPH (Tabela 11). Onze dos 21 genes que codificam fosfodiesterases aparentam possuir mutações novas, sendo que, entre esses, estão os genes das *PDEs 1A, 1C, 2A, 4B, 6A, 6B, 6C, 7A, 7B, 9A e 10A* (Tabela 12). Para essas mutações ainda não foram desenhados iniciadores para realizar o sequenciamento pela técnica de Sanger.

Tabela 8 - Análise dos 10 SNPs no gene da proteína PDE5A por sequenciamento do tipo Sanger nos 48 pacientes com CP.

Amostra	Ex02	Ex02	Ex08	Ex10	Ex17	Ex19	Ex19	Ex19	Ex19	Ex21
	Não sinônima rs3733526	Não sinônima rs17051276	Sinônima rs11947234	Sinônima rs148360694	2 pb do spliceossomo rs142272118	Não sinônimo rs114886951	5 pb do spliceossomo rs3733524	15 pb do spliceossomo rs3733523	Não sinônimo rs144204269	3 pb do spliceossomo rs1045177
DT01	A/A	A/A	A/A	T/C	C/C	A/G	T/T	C/C	T/T	G/G
DT02	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	G/G
DT03	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	G/G
DT04	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	A/G
DT05	A/G	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT06	A/G	A/C	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT07	A/A	A/A	A/G	C/C	C/C	A/A	T/C	T/C	T/T	G/G
DT08	A/A	A/A	A/G	C/C	C/C	A/A	T/C	T/C	T/T	G/G
DT09	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT10	A/A	A/A	A/A	C/C	C/T	A/A	T/T	C/C	T/T	A/G
DT11	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT12	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	G/G
DT13	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT14	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT15	G/G	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT16	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT17	A/G	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT18	A/G	A/A	A/G	C/C	C/C	A/A	T/C	T/C	T/T	G/G
DT19	A/A	A/A	A/G	C/C	C/C	A/A	T/C	T/C	T/T	G/G
DT20	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/T	T/C	T/T	x
DT21	A/G	A/C	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	G/G
DT22	A/G	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	G/G
DT23	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x

DT24	A/A	A/A	G/G	x	x	A/A	C/C	T/T	T/T	x
DT25	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT26	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT27	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/C	C/C	T/T	x
DT28	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT29	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT30	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT31	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT32	A/A	A/A	A/G	C/C	C/C	A/A	T/C	T/C	T/G	G/G
DT33	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT34	A/G	A/C	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT35	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	G/G
DT36	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/T	T/C	T/T	x
DT37	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT38	A/A	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	G/G
DT39	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT40	A/G	A/A	A/A	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT41	A/A	A/A	A/G	x	x	A/G	T/T	T/C	T/T	x
DT42	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT43	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT44	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT45	A/G	A/C	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T	C/C	T/T	G/G
DT46	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/C	T/C	T/T	x
DT47	A/A	A/A	A/A	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x
DT48	A/A	A/A	A/G	x	x	A/A	T/T	C/C	T/T	x

Nota: Ex refere-se à Éxon; pb refere-se à pares de base; x refere-se aos dados não coletados.

Tabela 9 - Análise estatística em relação a frequência alélica, entre a população mundial e entre europeus dos 10 polimorfismos encontrados nos seis genes para testar a homogeneidade das populações.

Gene	SNP	Comparação	Significância	Gene	SNP	Comparação	Significância
AR	rs1800053	DT X ALL	p= *	AR	rs1800053	DT X EUR	p=0,073 OR - 0,06 (95% CI, 0,00-0,54)
AR	rs6152	DT X ALL	p=0,750 OR - 1,79 (95% CI, 0,40-8,00)	AR	rs6152	DT X EUR	p=1 OR - 1,30 (95% CI, 0,28-6,06)
ARHGAP9	rs79948748	DT X ALL	p=0,707 OR - 1,08 (95% CI, 0,25-4,60)	ARHGAP9	rs79948748	DT X EUR	p=0,657 OR - 1,37 (95% CI, 0,31-5,99)
ATP7A	rs113968994	DT X ALL	p=0,574 OR - 1,68 (95% CI, 0,47-5,99)	ATP7A	rs113968994	DT X EUR	p=1 OR - 1,29 (95% CI, 0,35-4,77)
ATP7A	rs2227291	DT X ALL	p=1 OR - 0,90 (95% CI, 0,28-2,86)	ATP7A	rs2227291	DT X EUR	p=0,767 OR - 1,11 (95% CI, 0,34-3,63)
ATP7A	rs4826245	DT X ALL	p= **	ATP7A	rs4826245	DT X EUR	p= **
PTENP1	rs111298584	DT X ALL	p=0,479 OR - 0,70 (95% CI, 0,21-2,35)	PTENP1	rs111298584	DT X EUR	p=0,475 OR - 0,69 (95% CI, 0,20-2,36)
PTENP1	rs146747019	DT X ALL	p=0,102 OR - 3,97 (95% CI, 0,91-17,2)	PTENP1	rs146747019	DT X EUR	p=0,375 OR - 1,61 (95% CI, 0,36-7,08)
PTENP1	rs58865272	DT X ALL	p=0,999 OR - 0,96 (95% CI, 0,44-2,09)	PTENP1	rs58865272	DT X EUR	p=1 OR - 1,01 (95% CI, 0,46-2,22)
PTENP1	rs7853346	DT X ALL	p=0,999 OR - 1,03 (95% CI, 0,47-2,25)	PTENP1	rs7853346	DT X EUR	p=1 OR - 0,98 (95% CI, 0,44-2,16)

Nota: \* dados ausentes; \*\* polimorfismo descrito mas com frequência ausente em ambas populações; DT refere-se aos pacientes com CP; ALL refere-se aos controles da população mundial; EUR refere-se aos controles europeus.

Tabela 10 – Análise estatística da frequência alélica dos 22 polimorfismos maior significância estatística encontrados em todos os genes das PDEs.

Gene	SNP	População	Estatística % Alélica	Estatística % Genotípica
PDE1C	rs115957738	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,184 OR - 0,18 (95% CI, 0,02-1,46)	p=0,185
PDE1C	rs116449276	EUR	p=0,001 OR - 1,06 (95% CI, 0,97-1,16)	p=0,001
		ALL	p=0,008 OR - 0,05 (95% CI, 0,01-0,27)	p=0,008
PDE1C	rs76290787	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,264 OR - 0,28 (95% CI, 0,03-2,20)	p=0,265
PDE1C	rs78021925	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,452 OR - 1,72 (95% CI, 0,23-12,9)	p=0,785
PDE2A	rs392818	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,483 OR - 0,63 (95% CI, 0,08-4,77)	p=0,888
PDE2A	rs11824084	EUR	p=0,001 OR - 1,06 (95% CI, 0,97-1,16)	p=0,001
		ALL	p=0,098 OR - 0,24 (95% CI, 0,05-1,06)	p=0,097
PDE2A	rs4944557	EUR	p=0,001 OR - 1,06 (95% CI, 0,97-1,16)	p=0,001
		ALL	p=0,381 OR - 0,63 (95% CI, 0,14-2,70)	p=0,634
PDE2A	rs577536	EUR	p=0,000 OR - 1,10 (95% CI, 0,98-1,23)	p=0,001
		ALL	p=0,028 OR - 0,19 (95% CI, 0,05-0,67)	p=0,048
PDE4B	rs34492439	EUR	p=0,003 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,003
		ALL	p= *	p= *
PDE4B	rs114408173	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,172 OR - 0,17 (95% CI, 0,02-1,35)	p=0,173
PDE4B	rs7534999	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,587 OR - 0,86 (95% CI, 0,11-6,41)	p=0,928
PDE5A	rs3733526	EUR	p=0,052 OR - 0,51 (95% CI, 0,26-0,99)	p=0,059
		ALL	p=0,080 OR - 0,55 (95% CI, 0,29-1,04)	p=0,148
PDE5A	rs114886951	EUR	p=0,034 OR - 16,1 (95% CI, 1,44-179,)	p=0,034
		ALL	p=0,005 OR - 46,4 (95% CI, 4,17-516,)	p=0,005
PDE6A	rs113309832	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,295 OR - 0,32 (95% CI, 0,04-2,52)	p=0,555
PDE6B	rs61734864	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,231 OR - 4,11 (95% CI, 0,53-31,8)	p=0,473
PDE6B	rs73058408	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,014 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,014
PDE6C	rs193276411	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,148 OR - 0,14 (95% CI, 0,01-1,14)	p=0,148
PDE6C	rs76999928	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,295 OR - 3,03 (95% CI, 0,39-23,1)	p=0,297
PDE8A	rs148254104	EUR	p=0,011 OR - 0,00 (95% CI, 0,00-0,08)	p=0,011
		ALL	p= *	p= *
PDE8B	rs182775622	EUR	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	p=0,040
		ALL	p=0,028 OR - 0,01 (95% CI, 0,00-0,23)	p=0,028
PDE11A	rs75461311	EUR	p=0,000 OR - 26,9 (95% CI, 6,40-113,)	p=0,000
		ALL	p=0,029 OR - 3,80 (95% CI, 1,30-11,1)	p=0,079
PDE11A	rs79903863	EUR	p=0,000 OR - 1,10 (95% CI, 0,98-1,23)	p=0,000
		ALL	p=0,000 OR - 0,00 (95% CI, 0,00-0,04)	p=0,000

Nota: \* refere-se aos dados ausentes; % refere-se à frequência; ALL refere-se aos controles da população mundial; EUR refere-se aos controles europeus.

Tabela 11 - Frequência das alterações com significância estatística nos paciente analisados e seu possível efeito na estrutura da cadeia de aminoácidos.

SNP	Gene	% alélica em nossos pacientes	Valor de p para Europeus	Tipo / Localização	Efeito
rs116449276	PDE1C	6,25%	0,001	Íntron	*
rs115957738	PDE1C	3,13%	0,04	Sinônimo	*
rs76290787	PDE1C	3,13%	0,04	Sinônimo	*
rs78021925	PDE1C	3,13%	0,04	Íntron	*
rs577536	PDE2A	9,38%	0	Splice Site	*
rs11824084	PDE2A	6,25%	0,001	utr-3	*
rs4944557	PDE2A	6,25%	0,001	Sinônimo/ No spliceossomo	*
rs392818	PDE2A	3,13%	0,04	utr-3	*
rs34492439	PDE4B	3,13%	0,003	Sinônimo	*
rs114408173	PDE4B	3,13%	0,04	Íntron	*
rs7534999	PDE4B	3,13%	0,04	No spliceossomo	*
rs114886951	PDE5A	2,08%	0,034	Não Sinônimo / No spliceossomo	Possivelmente danoso
rs3733526	PDE5A	11,00%	0,052	Não Sinônimo	Benigno
rs113309832	PDE6A	3,13%	0,04	Íntron	*
rs73058408	PDE6B	3,13%	0,04	No spliceossomo	*
rs61734864	PDE6B	3,13%	0,04	Sinônimo / No spliceossomo	*
rs193276411	PDE6C	3,13%	0,04	Íntron	*
rs76999928	PDE6C	3,13%	0,04	Não Sinônimo / No spliceossomo	Possivelmente danoso
rs148254104	PDE8A	3,13%	0,011	Sinônimo	*
rs182775622	PDE8B	3,13%	0,04	Sinônimo	*
rs79903863	PDE11A	9,38%	0	Não Sinônimo	Danoso
rs75461311	PDE11A	12,50%	0	Íntron	*

Nota: Análise da frequência encontrada na população paciente com a intercalação dos dados dos programas SeattleSeq, PPH e SIFT de cada polimorfismo, e a significância estatística quando comparado com a população europeia. Utr-3 refere-se a região não traduzida sentido 3'; \* refere-se aos dados não passíveis de serem calculados pelos programas PPH e SIFT.

Tabela 12 - Localização das mutações, efeitos e frequências.

	Cromossomo	Posição	Troca de alelos	Tipo	Posição do Aminoácido	Distância do spliceossomo	Genótipo	PPH	SIFT	Leituras normais \ mutadas	Leituras totais	% alélica nos pacientes
AR	chrX	66779967	C/T	Sinônimo	587	8	1/1	*	Tolerável	4\37	41	6,25%
ARHGAP9	chr12	56159777	A/T	Íntron		3	0/1	*	*	7\3	10	3,13%
CDKL5	chrX	18512295	A/G	Íntron		7	1/1	*	*	4\27	31	6,25%
PDE1A	chr2	182813268	C/T	Íntron		2	0/1	*	*	20\6	29	12,50%
PDE1A	chr2	183095318	A/G	Sinônimo	11		0/1	*	Tolerável	47\35	82	3,13%
PDE1C	chr7	31884155	G/T	ASN,HIS	149		0/1	Benigno	Tolerável	28\17	45	9,38%
PDE2A	chr11	71993818	A/T	INTRON		10	0/1	*	*	11\5	16	3,13%
PDE4B	chr1	66231291	C/G	ASN,LYS	38		0/1	Benigno	Tolerável	26\36	62	3,13%
PDE4B	chr1	66570862	C/T	ARG,TRP	68		0/1	Possivelmente danoso	Danoso	35\7	43	3,13%
PDE6A	chr5	149304164	A/G	LEU,PRO	89		0/1	Possivelmente danoso	Danoso	27\17	44	12,50%
PDE6A	chr5	149294362	T/C	ASN,SER	196		0/1	Possivelmente danoso	Danoso	35\8	44	3,13%
PDE6B	chr4	618602	C/T	THR,ILE	202		0/1	Possivelmente danoso	Danoso	19\5	24	3,13%
PDE6B	chr4	649077	C/T	GLN,STOP	743		0/1	*	*	13\4	17	3,13%
PDE6C	chr10	95408566	A/G	Íntron			0/1	*	*	16\16	32	3,13%
PDE6C	chr10	95395810	C/T	Íntron		14	0/1	*	*	40\11	51	12,50%
PDE6C	chr10	95411802	G/C	Íntron		2	0/1	*	*	16\5	22	3,13%
PDE7A	chr8	66798399	A/T	LYS,STOP	366		0/1	*	*	9\7	16	3,13%
PDE7B	chr6	136536633	A/G	MET,ILE	239	6	0/1	Benigno	Tolerável	28\28	56	3,13%
PDE9A	chr21	43063910	G/T	LEU,ARG	406		0/1	Possivelmente danoso	Tolerável	22\7	29	3,13%
PDE10A	chr6	165782464	G/T	Íntron		7	0/1	*	*	28\5	33	6,25%
PTEN	chr10	89643765	A/T	ILE,ASN	28	4	0/1	Possivelmente danoso	Danoso	48\8	56	3,13%

Nota: Tabela gerada pela utilização dos dados do arquivo VCF e a intercalação dos dados do SeattleSeq, PPH e SIFT. \* refere-se a dados não passíveis de serem calculados pelos programas PPH e SIFT.

## 5. DISCUSSÃO

No início de 2011, devido aos resultados positivos previamente publicado por Fauz (Fauz, Horvath *et al.*, 2011), foi levantada a hipótese de que, além do *PDE11A*, os demais alvos dos medicamentos relacionados à disfunção erétil também poderiam estar envolvidos com o desenvolvimento do CP. Esses medicamentos são chamados de inibidores de PDE5, por terem como efeito primário a sua inibição e como um efeito secundário a inibição das PDE11 e PDE6. A PDE5 está presente em grande quantidade no corpo cavernoso do pênis, na próstata, músculo liso, pulmão, cerebelo e coração. Devido à sua distribuição, os PDE-5i, além de serem utilizados para tratar o problema de impotência, passaram a ser utilizados para a melhora na qualidade de vida após prostatectomia radical (Haffner, Landis *et al.*, 2005), para a diminuição nas chances de desenvolvimento de câncer de próstata (Chavez, Scott Coffield *et al.*, 2013), para controle da hipertensão pulmonar (Croom e Curran, 2008) e para a recuperação e melhora na evolução do prognóstico de doenças cardiovasculares (Lee e Kass, 2012).

Contudo, a relação da atividade da PDE5A no tecido prostático e nos demais tecidos ainda não foi totalmente esclarecida. Sabe-se que essa PDE desempenha um papel fundamental no controle da quantidade intracelular de cGMP (Hamilton, Hu *et al.*, 2013), e conseqüentemente na inibição de proliferação por PKG e PKA. A alteração da quantidade desse segundo mensageiro também está relacionada com a despolarização da membrana, levando à inibição da via do NO. Recentemente foi descoberto que a PDE5 e a PDE11 são responsáveis pela degradação e inibição de 86% da quantidade livre de cGMP na próstata (Hamilton, Hu *et al.*, 2013).

Em função do principal objetivo deste trabalho foi realizado uma análise completa de toda a região codificadora do gene *PDE5A* em tecido com câncer de próstata. As frequências dos polimorfismos encontrados foram comparados com a amostra neutra do *1000 Genome*. Através dos dados de sequenciamento obtidos, 10 SNPs foram encontrados na população paciente. No entanto apenas um demonstrou significância estatística para a predisposição genética (rs114886951), enquanto um segundo SNP aparentou estar no limite da significância (rs3733526) (Tabela 11).

A alteração referenciada como rs114886951 foi confirmada em 2 indivíduos, em heterozigose, entre os 48 pacientes (2,1%) através do método de sequenciamento de Sanger.

Enquanto em controles neutros, selecionados ao acaso na população, foi encontrado um único indivíduo dentre os 1.092 (<0,001%) da população mundial, e este era de origem europeia. A significância estatística desse resultado é de  $p=0,034$  e com o Odds Ratio (OR) de 16,1 (95% CI, 1,44-179) (Tabela 11). Através deste cálculo estima-se que a presença dessa alteração poderá elevar as chances de predisposição ao câncer de próstata em até 16 vezes. Esta alteração está localizada na base 2.333 do cDNA e é a segunda base do início do éxon 19, a qual resulta na alteração de uma isoleucina para uma treonina no aminoácido número 778 (p.Ile778Thr). É importante lembrar que, existe a possibilidade de que, em alguns casos, alterações em regiões de corte possam causar deleção e/ou inclusão de um éxon inteiro.

O aminoácido 778 está inserido próximo ao final do domínio catalítico (Uniprot, 2012), assim como também faz parte de uma das estruturas secundárias de alfa-hélice (Ryan, Diekhans *et al.*, 2009; Uniprot, 2012). Através de mecanismos de previsão da conformação tridimensional da proteína é possível estimar o quão profundo está localizado cada aminoácido dentro do centro proteico, resultando na inacessibilidade à solventes. Mudanças radicais no tipo de resíduo de aminoácido dentro do centro da proteína podem resultar na desestabilização geral do seu funcionamento (Ryan, Diekhans *et al.*, 2009). Levando em consideração o software de predição das consequências de alteração de aminoácidos PolyPhen-2 (PPH), o qual se baseia em fatores físicos e evolutivos para suas considerações comparativas, essa alteração no aminoácido 778 resultaria em uma desestabilização da proteína (Adzhubei, Schmidt *et al.*, 2010).

O que torna esse resultado ainda mais interessante é o fato de que existe a possibilidade de que alguns dos controles também carreguem alelos da predisposição ao câncer. Isso pode ocorrer pelo fato de serem indivíduos neutros (controles não rastreados e não caracterizados). No entanto, é indispensável a realização de uma análise funcional dessa mutação para fornecer informações mais concretas a respeito dos seus efeitos sobre a proteína.

A segunda alteração encontrada cuja frequência se mostrou significativa é conhecida como rs3733526. Este é o polimorfismo mais frequente do gene PDE5A em todas populações estudadas. De acordo com o projeto *1000 genome* a frequência na população mundial do alelo G é de 19%, no entanto, entre as diferentes populações, essa frequência varia, sendo que é mais comum na população de origem africana (32% para o G), com frequência intermediária na população europeia (20%) (Tabela 11) e menos frequente na população Asiática (9%). A frequência do alelo G encontrada entre os pacientes na nossa população (11%) foi menor

quando comparada com a europeia  $p=0,052$ ; OR - 0,51 (95% CI, 0,26-0,99). Esse resultado sugere que a presença do alelo pode resultar num efeito protetor do desenvolvimento da doença. No entanto, apenas com um número amostral maior seria possível elucidar a verdadeira significância dessa variante.

Esse polimorfismo está localizado no aminoácido de número 93 e resulta numa alteração *missense*, pela substituição de uma alanina por uma valina. Esta posição não pertence a nenhum tipo de domínio proteico conhecido e, assim como o rs114886951, compõem uma das estruturas alfa-hélice da proteína (Ryan, Diekhans *et al.*, 2009; Uniprot, 2012). No entanto a sua acessibilidade aos solventes é intermediária. Acredita-se que alterações nos resíduos de aminoácidos que estão expostos aos solventes podem desempenhar um papel na capacidade da proteína de interagir com outras moléculas (Ryan, Diekhans *et al.*, 2009). Todavia, o mecanismo de previsão de alteração molecular PPH descreve essa alteração como não danosa à cadeia de aminoácidos (Adzhubei, Schmidt *et al.*, 2010).

Dessa forma, a predominância do alelo menos frequente deste polimorfismo poderia estar associado a alteração interação da enzima com o ambiente intracelular devido a sua localização na proteína. Dessa foram sugerindo um efeito parecido ao que foi encontrado na atividade da PDE3 com a divergência de seu substrato específico (Tang, Jang *et al.*, 1997). Contudo, o seu efeito principal só será revelado após experimentos apropriados.

A fosfodiesterase 5A provavelmente não é a principal causadora do CP, mas devido à sua capacidade de interagir com várias vias de proliferação e apoptose, faz com que se torne fundamental entender melhor o seu funcionamento. Imagina-se que a utilização dos inibidores temporários como sildenafil, em baixas concentrações, possa trazer efeitos complementares a outras formas de tratamento mais eficazes. A inativação e o mau funcionamento constante, como em casos de alterações genéticas nocivas e tratamentos ininterruptos com tadalafila, podem trazer efeitos opostos dos esperados em um curto prazo. Devido à falta de conhecimento disponível sobre a real atuação nos tecidos em que é expressa, a utilização precoce dos seus inibidores como uma opção de tratamento poderia ser considerada uma “faca de dois gumes”.

Apesar dos genes *PDE5A* e *PDE11A* se demonstrarem relevantes no aumento da suscetibilidade de desenvolvimento do CP, não são capazes de explicar o surgimento da doença, visto que, não são os únicos genes expressos na próstata. Devido à seletividade e atuação específica de cada PDE imagina-se que estão diretamente relacionadas com a capacidade de

proliferação celular em tecidos específicos (Francis e Corbin, 1999). Acredita-se que a homeostase do funcionamento de todas as PDE em conjunto possam evitar eventos intracelulares de predisposição ao câncer, sendo que, um conjunto de desarranjos não só poderia significar a origem da doença como também uma maior facilidade de metástases (Levy, Horvath *et al.*, 2011).

Por esse motivo, como objetivo secundário deste trabalho, foi realizada uma verificação das variantes codificantes dos demais PDEs. Como resultado foram encontrados 18 SNPs, já previamente descritos, que demonstraram significância estatística espalhada pelos genes: *PDE1C*, *PDE2A*, *PDE4B*, *PDE6A*, *PDE6B*, *PDE6C*, *PDE8A* e *PDE8B* (Tabela 11); e 17 novas mutações espalhadas pelos genes: *PDE1A*, *PDE1C*, *PDE2A*, *PDE4B*, *PDE6A*, *PDE6B*, *PDE6C*, *PDE7A*, *PDE7B*, *PDE9A* e *PDE10A* (Tabela 12).

Quando verificada a frequência da maioria dessas alterações já descritas na literatura, nota-se a ausência completa em indivíduos caucasoides, porém estão presentes na população mundial. A princípio, sem verificar a frequência dessas alterações nas demais populações, pode-se imaginar que o seu aparecimento está relacionado com uma possível contaminação por miscigenação da população. No entanto, quando levada em consideração a frequência dessas alterações em outras populações, usando como exemplo o indivíduo DT02, que possui um menor número dessas combinações, encontra-se uma chance estimada inferior a 1 em 142 mil de acontecer ao acaso. Ademais, essa combinação de SNPs raros não ocorre em apenas um indivíduo, mas sim em 25% do conjunto amostral (Tabela 13<sup>1</sup>).

Através da tabulação dos dados foi possível verificar a presença de pelo menos duas novas mutações em outros nove indivíduos (Tabela 13<sup>2</sup>). Destes, somente um indivíduo possuía apenas um SNP significativo (Tabela 13<sup>3</sup>), e um outro não possuía qualquer tipo de mutação ou polimorfismo relacionado às PDEs (Tabela 13<sup>4</sup>).

Tabela 13 - Combinação das alterações com significância estatística em seus respectivos pacientes.

Novel	PDE1C	PDE2A	PDE4B	PDE5A	PDE6A	PDE6B	PDE6C	PDE8A	PDE8B	PDE11A
<b>DT01<sup>1</sup></b>	rs115957738	rs577536 rs11824084		rs114886951						rs79903863 rs75461311
<b>DT02<sup>1</sup></b>		rs4944557 rs392818					rs193276411			rs75461311
<b>DT03<sup>1</sup></b>	PDE6C	rs76290787 rs78021925	rs11824084	rs114408173						rs75461311
<b>DT04<sup>4</sup></b>										
PDE6C <b>DT07<sup>2</sup></b>										rs79903863
PDE7B PDE10A		rs4944557								
PDE1A <b>DT08<sup>2</sup></b>										
PDE6A PDE6C										rs79903863
<b>DT10<sup>2</sup></b>	PDE6A									rs75461311
	PDE6C									
<b>DT12<sup>2</sup></b>	PDE1A									
	PDE6B									
<b>DT18<sup>3</sup></b>				rs3733526						
PDE1A										
PDE4B <b>DT19<sup>2</sup></b>										
PDE6A PDE6B							rs76999928			
PDE7A <b>DT21</b>										
PDE6A				rs3733526						
<b>DT22<sup>2</sup></b>	PDE1A			rs3733526						
	PDE1C									
<b>DT32<sup>2</sup></b>	PDE1C									
	PDE2A									
<b>DT35<sup>2</sup></b>	PDE1A									
	PDE6C	rs577536					rs148254104			
<b>DT38<sup>1</sup></b>	PDE1C		rs34492439		rs113309832	rs73058408				
	PDE4B	rs116449276	rs7534999			rs61734864				
<b>DT45<sup>2</sup></b>	PDE10A	rs116449276		rs3733526					rs182775622	

Nota: <sup>1</sup> Os quatro pacientes com pelo menos 4 alterações frequentes somente em negroides; <sup>2</sup> Os nove pacientes com pelo menos 2 mutações novas; <sup>3</sup> O indivíduo com apenas 1 SNP com significância estatística; <sup>4</sup> O paciente sem alterações significativas nos genes das fosfodiesterases.

Esses resultados não só confirmam a associação entre *PDE11A* com o câncer de próstata previamente descrita, mas também demonstram que um conjunto de desarranjos em diferentes PDEs podem estar associados com o surgimento da doença. É importante observar que as chances de que existam três mutações novas com uma frequência de 12% em nossa população (Tabela 12) é bastante pequena. Essa frequência sugere a existência de falsos positivos, apesar de terem sido tomados todos os cuidados para a seleção e caracterização das mutações. Dessa forma, é de imprescindível importância a realização do sequenciamento para a confirmação dessas mutações antes de qualquer conclusão a respeito desses genes. Também, quando analisado os efeitos de cada um dos polimorfismos associados com o câncer de próstata, verifica-se que nove são SNPs sinônimos (sSNPs) (Tabela 11).

Até pouco tempo, sSNPs eram considerados silenciosos, justamente por não ocasionarem alterações na sequência de aminoácidos. No entanto, recentemente um grupo conseguiu provar que alterações não sinônimas (nsSNPs) e sSNPs possuem chances parecidas de estarem associadas com o desenvolvimento de doenças, sendo também capazes de gerar efeitos similares (Chen, Davydov *et al.*, 2010). Exemplos de como essas trocas de bases podem influenciar: a) Alterações de região de reconhecimento dos spliceossomos capazes de silenciar éxons inteiros e gerar proteínas não funcionais; b) Instabilidades da estrutura tridimensional do RNAm, sendo que essas diferenças podem resultar em uma maior facilidade de degradação e/ou dificuldade no início da tradução gerando uma menor quantidade de proteínas; c) Acredita-se na existência de uma cinética da velocidade de tradução, sendo que códons mais raros estariam no início da tradução e estariam responsáveis por frear e evitar um congestionamento, enquanto os mais comuns estariam após os 50-60 códons iniciais para agilizar o processo. Dessa forma alterações sSNPs poderiam diminuir a velocidade de síntese proteica ou até mesmo um enrolamento incorreto da proteína resultando em proteotoxicidade; d) sSNPs podem interferir nas pausas de tradução e causar alterações nas conformações secundárias e terciárias, resultando em conformações tridimensionais diferentes (Sauna e Kimchi-Sarfaty, 2011). Desta forma fica claro que, apesar da maior parte das alterações encontradas serem sinônimas, esses polimorfismos podem gerar um mau funcionamento da proteína final podendo promover o desenvolvimento de câncer.

O outro gene analisado por esse estudo é o *PRKARIA*. Este gene codifica a subunidade regulatória R1 $\alpha$  da PKA, a qual é ativada pelo segundo mensageiro cAMP e, através dessa interação, regula a atividade catalítica de toda a proteína. Quando desassociada, a região

catalítica possui a capacidade de gerar uma cascata de fosforilação resultando em: expressão gênica, proliferação celular, sinalização por BAD, eNOS, ERK, Ras, Raf, Wnt e outras vias (Robinson-White, Hundley *et al.*, 2003; Chen, Ginty *et al.*, 2005; Mantovani, Lania *et al.*, 2008; Larizza, Gervasini *et al.*, 2009; Bir, Xiong *et al.*, 2012). Como a R1 $\alpha$  é a principal subunidade regulatória, e é expressa em quase todos os tecidos principalmente em tecidos endócrinos (Robinson-White, Hundley *et al.*, 2003), acredita-se que qualquer alteração que comprometa a sua função possa causar uma dissociação prematura das subunidades catalíticas e uma possível fosforilação descontrolada de seus alvos específicos (Mantovani, Lania *et al.*, 2008).

Não é esperado que indivíduos nasçam com mutações neste gene, devido a importância de seu funcionamento. Normalmente alterações congênitas neste gene estão relacionados ao desenvolvimento de síndromes. O que se espera para os casos esporádicos são mutações ao acaso durante o desenvolvimento adulto do indivíduo como em tumores de ovário, câncer de tireoide (Bertherat, Horvath *et al.*, 2009), tumores de Células de Sertoli Calcificados (LCCSCT) e Leucemia Promielocítica Aguda (APL) (Catalano, Dawson *et al.*, 2007). Erros genéticos que possam ser passados para o progênito ou desenvolvido durante a fase embrionária, estão mais associados com doenças como Complexo de Carney (Groussin, Kirschner *et al.*, 2002) e Síndrome de Cushing (Horvath, Bossis *et al.*, 2008; Bertherat, Horvath *et al.*, 2009).

Existe uma grande relação entre a atividade da PKA com o desenvolvimento do CP (Chung, Furihata *et al.*, 2009; Desiniotis, Schafer *et al.*, 2010). Muitos estudos de GWAS e LOH sugerem que o locus em que este gene está inserido é uma das causas da doença (Gudmundsson, Sulem *et al.*, 2007; Eeles, Kote-Jarai *et al.*, 2008; Sun, Purcell *et al.*, 2008; Eeles, Kote-Jarai *et al.*, 2009; Penney, Salinas *et al.*, 2009). Outros fatores que levam a acreditar na importância dessa proteína é a sensibilidade do tecido prostático ao cAMP (Faucz, Horvath *et al.*, 2011), os altos níveis desse segundo mensageiro em tecido cancerígeno já foram associados com a doença (Dimitriadis, Giannakis *et al.*, 2008; Sarwar, Sandberg *et al.*, 2013) e também à sua capacidade de tornar o tumor hormônio-independente (Tortora, Pepe *et al.*, 1994; Sarwar, Sandberg *et al.*, 2013).

Apesar de todos os indícios e expectativas em cima da genética desse gene, nenhuma variabilidade genética pode ser observada. Essa ausência de mutações exclui a hipótese de que a funcionalidade da região regulatória da proteína PKA esteja comprometida em pacientes com câncer de próstata. Devido a não identificação de mutações que possam gerar alterações da proteína, esse trabalho também pode sugerir que a utilização das quantidades intracelulares de

cAMP está de acordo com a funcionalidade esperada para essa proteína. Dessa forma, um possível excesso desse segundo mensageiro não preveniria a sua falta de utilização, no entanto, pode-se imaginar que uma provável origem para o seu excesso seria pela falta da hidrolização da molécula.

Este trabalho traz uma grande contribuição para o meio científico pôr provar que a sequência exônica para o gene *PRKARIA* encontrada em nossos pacientes é a mesma encontrada em controles. Contudo, não se pode esquecer de que ainda existem várias evidências de que a *PRKARIA* está associada com o desenvolvimento do câncer de próstata. Os seus níveis de expressão já foram encontrados em maior quantidade em tecido afetado quando comparado com o tecido normal, assim como, o lócus do gene já foi fortemente associado à doença CP.

Apesar do presente trabalho mostrar que a sequência de aminoácidos está de acordo com o esperado para um indivíduo normal, ele não exclui a possibilidade da associação do gene com a doença. É importante lembrar que ainda existem outras possibilidades de erros genéticos como metilação errônea, LOH e outros fatores de transcrição envolvidos no processo, os quais não foram abordados por este estudo. Porém, os trabalhos de associação que identificaram o lócus cromossômico, não identificam a posição exata do problema (Bertherat, Groussin *et al.*, 2003; Yeager, Chatterjee *et al.*, 2009; Haiman, Chen *et al.*, 2011). Isso pode significar a existência da possibilidade de que outros genes, próximos à esta região, sejam os verdadeiros envolvidos.

Além da análise estatística realizada para os genes pertencentes à família das PDEs e o *PRKARIA*, o presente trabalho também adicionou à sua análise outros 6 genes, tentando assim provar a homogeneidade dos pacientes com os controles neutros (população não rastreada) do *1000 Genome Project*. A análise desses genes resultou na verificação de 11 SNPs já descritos, que na sua totalidade não mostraram diferença significativa através de análise estatística. Também é relevante lembrar que apenas 21 demonstraram um  $p < 0,05$  entre as 133 variantes descritas e analisadas.

Atualmente já é aceito pela comunidade científica a utilização do projeto *1000 Genome* como controles, justamente pelo fato da sua capacidade única de trazer informações sobre algumas doenças complexas (Curtin, Iles *et al.*, 2009). É importante destacar que um dos motivos para a constituição desse projeto é, justamente, que pesquisadores utilizem esses dados como controles ou informações adicionais para comparações com suas amostras de pacientes com doenças específicas ou de outras populações (Genomes Project, Abecasis *et al.*, 2010).

Muitos trabalhos também vem discutindo a capacidade excepcional deste projeto de detectar mutações raras em diferentes populações (Genomes Project, Abecasis *et al.*, 2012) assim como a qualidade dos resultados obtidos (Clarke, Zheng-Bradley *et al.*, 2012).

É importante lembrar que a doença caracterizada como câncer de próstata já foi demonstrada por vários autores estar quase que onipresente em homens idosos (Sakr, Haas *et al.*, 1993; Sakr, Grignon *et al.*, 1996; Gronberg, 2003). Um desses autores descreveu que as chances do aparecimento de câncer de próstata aumentam progressivamente com o avançar da idade (cerca de 10%, 30%, 40%, 45%, 70% e 80% na 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> década, respectivamente) (Sakr, Grignon *et al.*, 1996). A utilização de controles neutros já é utilizado em muitos estudos sobre a etiologia do câncer de próstata, pois acredita-se que o uso de controles rastreados apenas forneceria informações sobre a detecção de casos precoces, enquanto fatores de marcação tardios mais importantes ficariam mascarados (Martin, 2007).

Apesar de que a população brasileira é considerada como única, devido ao alto grau de miscigenação entre as diversas populações de outros continentes com as nativas torna a nossa genética incapacitada de comparar com as dos descendentes de seus ancestrais (Alves-Silva, Santos *et al.*, 1999; Ribeiro, Santos *et al.*, 2002), deve-se considerar também que a maior parte da imigração no Brasil é originária dos países europeus e que, ainda hoje, existem maiores concentrações dessas populações conservadas principalmente no sul do país (Aronson, 1975). Alguns trabalhos já demonstraram a semelhança genética entre a nossa população caucasóide com as de origem europeia (Bogdawa, Hutz *et al.*, 2000; Faucez, Probst *et al.*, 2000; Martins, Silva *et al.*, 2010; Giacomazzi, Aguiar *et al.*, 2011).

Deve-se considerar que além dos fatores étnicos e geográficos existem genes que permaneceram mais ou menos conservados durante o processo evolutivo e as fosfodiesterases possuem sequências e funções altamente conservadas interespecies (Halpin, 2008). Isto sugere que qualquer tipo de alteração drástica na sua essência pode acarretar em consequências graves. Outrossim o câncer de próstata é uma doença global e aparenta ter uma origem comum (Niclis, Diaz Mdel *et al.*, 2012; Siegel, Naishadham *et al.*, 2012).

Desta forma, dependendo dos fatores analisados e das populações alvo de estudo, o nível de contaminação por miscigenação pode ser insuficiente para descaracterizar a amostra. Assim sendo, esse estudo tenta contra argumentar a incapacidade de comparação genética dada da

exclusividade de origem do material genético da população brasileira se levado em consideração alguns critérios na hora da seleção dos indivíduos.

É importante também lembrar, que existe a possibilidade de já terem ocorrido vários erros de associação a polimorfismos raros com doenças comuns antes do início do projeto *1000 Genome*, principalmente pela falta de um banco de dado completo, caracterizando o material genético nas diversas populações mundiais. Como exemplo pode ser citado a associação da mutação p.Ser827Gly no gene *PATCHED-1* com indivíduos com holoprosencefalia (Ming, Kaupas *et al.*, 2002). Somente após uma década essa mesma mutação foi descrita como rara em indivíduos asiáticos e não responsável por causar a doença (Huang, Bu *et al.*, 2013), no entanto, já poderia ter chegado a essa conclusão anteriormente se algum pesquisador tivesse comparado essa mutação com os resultados do projeto *1000 Genome* (Genomes Project, Abecasis *et al.*, 2010). Dessa forma fica claro a autenticidade e confiabilidade utilizada neste trabalho, porém existe a necessidade de que o projeto seja continuado e que todas as mutações encontradas sejam confirmadas por sequenciamento convencional antes de serem apresentadas ao meio científico.

## 6. CONCLUSÃO

Através da utilização da plataforma de NGS e por sequenciamento do tipo Sanger, foi possível analisar os genes responsáveis pela produção das proteínas envolvidas na degradação de cAMP e cGMP (a família das fosfodiesterases) e do gene *PRKARIA*. Os dados das variações obtidos por essas plataformas foram tabulados e então foram realizadas análises estatísticas entre pacientes e controles. Não foram encontradas alterações genéticas no gene *PRKARIA* capazes de modificar a sequência de aminoácidos e não foi encontrado significância estatística com qualquer polimorfismo já descrito.

Também foram analisadas todas as variantes codificantes do gene *PDE5A* que, através dessa análise, foi possível chegar à conclusão que existem 2 alterações prováveis de estarem envolvidas com o desenvolvimento do CP. A alteração rs114886951 aparenta estar relacionada com uma possível desestabilização do centro da proteína e da região regulatória, enquanto a

rs3733526 aparentemente parece estar relacionada com a capacidade da proteína de interagir com o ambiente externo.

Entre os demais genes da família das fosfodiesterases foi possível encontrar várias alterações já descritas entre as diferentes PDEs nos diferentes pacientes que aparentam estar associadas com a doença. Além dessas alterações foi possível encontrar mutações novas e aparentemente relacionadas especificamente com a doença. Essa análise levou a concluir que um conjunto de polimorfismos pode causar um desarranjo simultâneo nas diferentes PDEs e alterar a homeostase dos segundos mensageiros podendo ser uma das causas de CP.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUSNINA, A. et al. Anti-proliferative effect of curcumin on melanoma cells is mediated by PDE1A inhibition that regulates the epigenetic integrator UHRF1. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, n. 11, p. 1677-89, Nov 2011. ISSN 1613-4133 (Electronic)

1613-4125 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045655> >.

ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nat Methods**, v. 7, n. 4, p. 248-9, Apr 2010. ISSN 1548-7105 (Electronic)

1548-7091 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354512> >.

AHLGREN, R. et al. Role of Sp1 in cAMP-dependent transcriptional regulation of the bovine CYP11A gene. **J Biol Chem**, v. 274, n. 27, p. 19422-8, Jul 2 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383457> >.

ALBERTI, C. Hereditary/familial versus sporadic prostate cancer: few indisputable genetic differences and many similar clinicopathological features. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 14, n. 1, p. 31-41, Jan 2010. ISSN 1128-3602 (Print)

1128-3602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20184087> >.

ALMEIDA, M. Q. et al. Activation of cyclic AMP signaling leads to different pathway alterations in lesions of the adrenal cortex caused by germline PRKAR1A defects versus those due to somatic GNAS mutations. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 4, p. E687-93, Apr 2012. ISSN 1945-7197 (Electronic)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22259056> >.

ALMEIDA, M. Q.; STRATAKIS, C. A. How does cAMP/protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues? **Mol Cell Endocrinol**, v. 336, n. 1-2, p. 162-8, Apr 10 2011. ISSN 1872- 8057 (Electronic)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111774> >.

ALVES-SILVA, J. et al. Multiple geographic sources of region V 9-bp deletion haplotypes in Brazilians. **Hum Biol**, v. 71, n. 2, p. 245-59, Apr 1999. ISSN 0018-7143 (Print)

0018-7143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10222646> >.

ANANT, J. S. et al. In vivo differential prenylation of retinal cyclic GMP phosphodiesterase catalytic subunits. **J Biol Chem**, v. 267, n. 2, p. 687-90, Jan 15 1992. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309771> >.

ANDERSSON, K. E. LUTS treatment: future treatment options. **Neurourol Urodyn**, v. 26, n. 6 Suppl, p. 934-47, Oct 2007. ISSN 0733-2467 (Print)

0733-2467 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696154> >.

ANDERSSON, K. E. et al. Phosphodiesterases (PDEs) and PDE inhibitors for treatment of LUTS. **Neurourol Urodyn**, v. 26, n. 6 Suppl, p. 928-33, Oct 2007. ISSN 0733-2467 (Print)

0733-2467 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17806124> >.

ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. **Trends Biochem Sci**, v. 23, n. 12, p. 469-72, Dec 1998. ISSN 0968-0004 (Print)

0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9868367> >.

ARNAUD-LOPEZ, L. et al. Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. **Am J Hum Genet**, v. 82, n. 6, p. 1270-80, Jun 2008. ISSN 1537-6605 (Electronic)

0002-9297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514160> >.

ARONSON, S. M. Continuing medical education resources for the practicing Rhode Island physician. **R I Med J**, v. 58, n. 1, p. 3-4, Jan 1975. ISSN 0360-067X (Print)

0360-067X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/124077> >.

BAILLIE, G. S. et al. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. **Br J Pharmacol**, v. 131, n. 4, p. 811-9, Oct 2000. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030732> >.

BARRY, M. J. Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. **N Engl J Med**, v. 344, n. 18, p. 1373-7, May 3 2001. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11333995> >.

BEARD, M. B. et al. UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. **J Biol Chem**, v. 275, n. 14, p. 10349-58, Apr 7 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10744723> >.

BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol Rev**, v. 75, n. 4, p. 725-48, Oct 1995. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480160> >.

BEGUM, N.; SHEN, W.; MANGANIELLO, V. Role of PDE3A in regulation of cell cycle progression in mouse vascular smooth muscle cells and oocytes: implications in cardiovascular diseases and infertility. **Curr Opin Pharmacol**, v. 11, n. 6, p. 725-9, Dec 2011. ISSN 1471-4973 (Electronic)

1471-4892 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22051884> >.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 488-520, Sep 2006. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968949> >.

BERTHERAT, J. et al. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. **Cancer Res**, v. 63, n. 17, p. 5308-19, Sep 1 2003. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500362> >.

BERTHERAT, J. et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 6, p. 2085-91, Jun 2009. ISSN 1945-7197 (Electronic)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19293268> >.

BERTHON, P. et al. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. **Am J Hum Genet**, v. 62, n. 6, p. 1416-24, Jun 1998. ISSN 0002-9297 (Print)

0002-9297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585607> >.

BIAN, K. et al. NOS-2 signaling and cancer therapy. **IUBMB Life**, v. 64, n. 8, p. 676-83, Aug 2012. ISSN 1521-6551 (Electronic)

1521-6543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22715033> >.

BIAN, K.; MURAD, F. Nitric oxide (NO)--biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. **Front Biosci**, v. 8, p. d264-78, Jan 1 2003. ISSN 1093-4715 (Electronic)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456375> >.

BIMPAKI, E. I.; NESTEROVA, M.; STRATAKIS, C. A. Abnormalities of cAMP signaling are present in adrenocortical lesions associated with ACTH-independent Cushing syndrome despite the absence of mutations in known genes. **Eur J Endocrinol**, v. 161, n. 1, p. 153-61, Jul 2009. ISSN 1479-683X (Electronic)

0804-4643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429701> >.

BIR, S. C. et al. Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. **Cardiovasc Res**, v. 95, n. 1, p. 7-18, Jul 1 2012. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492672> >.

BISCHOFF, E. Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition. **Int J Impot Res**, v. 16 Suppl 1, p. S11-4, Jun 2004. ISSN 0955-9930 (Print)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15224129> >.

BOGDAWA, H. M. et al. Diversity of two short tandem repeat loci (CD4 and F13A1) in three Brazilian ethnic groups. **Hum Biol**, v. 72, n. 6, p. 1045-53, Dec 2000. ISSN 0018-7143 (Print)

0018-7143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11236860> >.

BOIKOS, S. A. et al. Phosphodiesterase 11A expression in the adrenal cortex, primary pigmented nodular adrenocortical disease, and other corticotropin-independent lesions. **Horm Metab Res**, v. 40, n. 5, p. 347-53, May 2008. ISSN 0018-5043 (Print)

0018-5043 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18491255> >.

BOURDEAU, I.; STRATAKIS, C. A. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 968, p. 240-55, Jun 2002. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119280> >.

BURNETT, A. L. The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 8, n. 12 Suppl 4, p. 53-62, Dec 2006. ISSN 1524-6175 (Print)

1524-6175 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170606> >.

BUTCHER, R. W.; SUTHERLAND, E. W. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. **J Biol Chem**, v. 237, p. 1244-50, Apr 1962. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13875173> >.

CATALANO, A. et al. The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 4073-6, Dec 1 2007. ISSN 0006-4971 (Print)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17712046> >.

CHANDRAN, U. R. et al. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. **BMC Cancer**, v. 7, p. 64, 2007. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430594> >.

CHAVEZ, A. H. et al. Incidence rate of prostate cancer in men treated for erectile dysfunction with phosphodiesterase type 5 inhibitors: retrospective analysis. **Asian J Androl**, v. 15, n. 2, p. 246-8, Mar 2013. ISSN 1745-7262 (Electronic)

1008-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23353723> >.

CHEN, A. E.; GINTY, D. D.; FAN, C. M. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. **Nature**, v. 433, n. 7023, p. 317-22, Jan 20 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15568017> >.

CHEN, R. et al. Non-synonymous and synonymous coding SNPs show similar likelihood and effect size of human disease association. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13574, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042586> >.

CHIBA, T.; MARUSAWA, H.; USHIJIMA, T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 550-63, Sep 2012. ISSN 1528-0012 (Electronic)

0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796521> >.

CHUNG, S. et al. Overexpressing PKIB in prostate cancer promotes its aggressiveness by linking between PKA and Akt pathways. **Oncogene**, v. 28, n. 32, p. 2849-59, Aug 13 2009. ISSN 1476-5594 (Electronic)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19483721> >.

CLARKE, L. et al. The 1000 Genomes Project: data management and community access. **Nat Methods**, v. 9, n. 5, p. 459-62, May 2012. ISSN 1548-7105 (Electronic)

1548-7091 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22543379> >.

CONTI, M.; JIN, S. L. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 63, p. 1-38, 1999. ISSN 0079-6603 (Print)

0079-6603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506827> >.

CORBIN, J. D. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. **Int J Impot Res**, v. 16 Suppl 1, p. S4-7, Jun 2004. ISSN 0955-9930 (Print)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15224127> >.

CORNWELL, T. L. et al. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. **Am J Physiol**, v. 267, n. 5 Pt 1, p. C1405-13, Nov 1994. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7977701> >.

CROOM, K. F.; CURRAN, M. P. Sildenafil: a review of its use in pulmonary arterial hypertension. **Drugs**, v. 68, n. 3, p. 383-97, 2008. ISSN 0012-6667 (Print)

0012-6667 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18257613> >.

CURTIN, K.; ILES, M. M.; CAMP, N. J. Identifying rarer genetic variants for common complex diseases: diseased versus neutral discovery panels. **Ann Hum Genet**, v. 73, n. 1, p. 54-60, Jan 2009. ISSN 1469-1809 (Electronic)

0003-4800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132978> >.

DA SILVA, F. H. et al. Phosphodiesterase-9 (PDE9) inhibition with BAY 73-6691 increases corpus cavernosum relaxations mediated by nitric oxide-cyclic GMP pathway in mice. **Int J Impot Res**, v. 25, n. 2, p. 69-73, Mar-Apr 2013. ISSN 1476-5489 (Electronic)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034509> >.

DEGERMAN, E.; BELFRAGE, P.; MANGANIELLO, V. C. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). **J Biol Chem**, v. 272, n. 11, p. 6823-6, Mar 14 1997. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9102399> >.

DEKOMIEN, G.; EPPLEN, J. T. Analysis of PDE6D and PDE6G genes for generalised progressive retinal atrophy (gPRA) mutations in dogs. **Genet Sel Evol**, v. 35, n. 4, p. 445-56, Jul-Aug 2003. ISSN 0999-193X (Print)

0999-193X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927076> >.

DEL PRETE, A. et al. Molecular pathways in cancer-related inflammation. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 21, n. 3, p. 264-75, 2011. ISSN 1330-0962 (Print)

1330-0962 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22420240> >.

DESINIOTIS, A. et al. Enhanced antiproliferative and proapoptotic effects on prostate cancer cells by simultaneously inhibiting androgen receptor and cAMP-dependent protein kinase A. **Int J Cancer**, v. 126, n. 3, p. 775-89, Feb 1 2010. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19653278> >.

DIMITRIADIS, F. et al. Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. **Asian J Androl**, v. 10, n. 1, p. 115-33, Jan 2008. ISSN 1008-682X (Print)

1008-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18087651> >.

DODGE-KAFKA, K. L. et al. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 574-8, Sep 22 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177794> >.

DONG, H. et al. Phosphodiesterase 8 (PDE8) regulates chemotaxis of activated lymphocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 345, n. 2, p. 713-9, Jun 30 2006. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16696947> >.

DONG, J. T. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 20, n. 3-4, p. 173-93, 2001. ISSN 0167-7659 (Print) 0167-7659 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085961> >.

DRUDGE-COATES, L.; TURNER, B. Prostate cancer overview. Part 1: non-metastatic disease. **Br J Nurs**, v. 21, n. 9, p. S23-8, May 10-23 2012. ISSN 0966-0461 (Print) 0966-0461 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690411> >.

DRYJA, T. P. et al. Frequency of mutations in the gene encoding the alpha subunit of rod cGMP-phosphodiesterase in autosomal recessive retinitis pigmentosa. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 40, n. 8, p. 1859-65, Jul 1999. ISSN 0146-0404 (Print) 0146-0404 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393062> >.

DURAND, J. et al. Characterization of differential gene expression in adrenocortical tumors harboring beta-catenin (CTNNB1) mutations. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 7, p. E1206-11, Jul 2011. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565795> >.

EELES, R. A. et al. Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study. **Nat Genet**, v. 41, n. 10, p. 1116-21, Oct 2009. ISSN 1546-1718 (Electronic) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767753> >.

EELES, R. A. et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. **Nat Genet**, v. 40, n. 3, p. 316-21, Mar 2008. ISSN 1546-1718 (Electronic) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264097> >.

EKSTROM, L. et al. Bioavailability of testosterone enanthate dependent on genetic variation in the phosphodiesterase 7B but not on the uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase (UGT2B17) gene. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 6, p. 325-32, Jun 2011. ISSN 1744-6880 (Electronic)

1744-6872 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383644> >.

EL-MAS, M. M.; FAN, M.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Facilitation of myocardial PI3K/Akt/nNOS signaling contributes to ethanol-evoked hypotension in female rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, n. 7, p. 1158-68, Jul 2009. ISSN 1530-0277 (Electronic)

0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389198> >.

ENGELS, P.; FICHTEL, K.; LUBBERT, H. Expression and regulation of human and rat phosphodiesterase type IV isogenes. **FEBS Lett**, v. 350, n. 2-3, p. 291-5, Aug 22 1994. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8070581> >.

ENGELS, P. et al. Molecular cloning and functional expression in yeast of a human cAMP-specific phosphodiesterase subtype (PDE IV-C). **FEBS Lett**, v. 358, n. 3, p. 305-10, Jan 30 1995. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7843419> >.

ERNEUX, C. et al. Specificity of cyclic GMP activation of a multi-substrate cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat liver. **Eur J Biochem**, v. 115, n. 3, p. 503-10, Apr 1981. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6263632> >.

FAUCZ, F. R.; BERTOLLO DE ALEXANDRE, R.; STRATAKIS, C. A. Phosphodiesterases: genes and their variants, inhibitors and potential therapeutic applications. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v. 6, n. 4, p. 497-499, 2011/07/01 2011. ISSN 1744-6651

1744-8417. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1586/eem.11.48> >. Acesso em: 2013/02/26.

FAUCZ, F. R. et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) genetic variants may increase susceptibility to prostatic cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 1, p. E135-40, Jan 2011. ISSN 1945-7197 (Electronic)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881257> >.

FAUCZ, F. R.; PROBST, C. M.; PETZL-ERLER, M. L. Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. **Eur J Immunogenet**, v. 27, n. 1, p. 5-16, Feb 2000. ISSN 0960-7420 (Print)

0960-7420 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10651845> >.

FAWCETT, L. et al. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 7, p. 3702-7, Mar 28 2000. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725373> >.

FERRIS-I-TORTAJADA, J. et al. [Constitutional risk factors in prostate cancer]. **Actas Urol Esp**, v. 35, n. 5, p. 282-8, May 2011. ISSN 1699-7980 (Electronic)

0210-4806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21435741> >.

FISHER, D. A. et al. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 25, p. 15559-64, Jun 19 1998. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624146> >.

FORTE, L. R. et al. Stimulation of intestinal Cl-transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP- dependent protein kinase by cGMP. **Am J Physiol**, v. 263, n. 3 Pt 1, p. C607-15, Sep 1992. ISSN 0002- 9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1329520> >.

FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 36, n. 4, p. 275-328, Aug 1999. ISSN 1040-8363 (Print)

1040-8363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10486703> >.

FUJISHIGE, K. et al. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). **J Biol Chem**, v. 274, n. 26, p. 18438-45, Jun 25 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10373451> >.

FUJISHIGE, K. et al. The human phosphodiesterase PDE10A gene genomic organization and evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 19, p. 5943-51, Oct 2000. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998054> >.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 7, p. 521-34, Jul 2006. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16794635> >.

GARDNER, C. et al. Cloning and characterization of the human and mouse PDE7B, a novel cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 272, n. 1, p. 186-92, May 27 2000. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872825> >.

GELMAN, I. H. Suppression of tumor and metastasis progression through the scaffolding functions of SSeCKS/Gravin/AKAP12. **Cancer Metastasis Rev**, v. 31, n. 3-4, p. 493-500, Dec 2012. ISSN 1573-7233 (Electronic)

0167-7659 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22684366> >.

GENOMES PROJECT, C. et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061-73, Oct 28 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981092> >.

GENOMES PROJECT, C. et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 56-65, Nov 1 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23128226> >.

GIACOMAZZI, J. et al. Prevalence of the STK15 F31I polymorphism and its relationship with mammographic density. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 4, p. 291-6, Apr 2011. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412660> >.

GIBBS, M. et al. Analysis of chromosome 1q42.2-43 in 152 families with high risk of prostate cancer. **Am J Hum Genet**, v. 64, n. 4, p. 1087-95, Apr 1999. ISSN 0002-9297 (Print)

0002-9297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10090894> >.

GIBSON, G. Hints of hidden heritability in GWAS. **Nat Genet**, v. 42, n. 7, p. 558-60, Jul 2010. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581876> >.

GILLES-GONZALEZ, M. A.; GONZALEZ, G. Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 2, p. 774-83, Feb 2004. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715687> >.

GLAVAS, N. A. et al. T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 11, p. 6319-24, May 22 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371644> >.

GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 707-36, 1995. ISSN 0066-4278 (Print)

0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539994> >.

GRONBERG, H. Prostate cancer epidemiology. **Lancet**, v. 361, n. 9360, p. 859-64, Mar 8 2003. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642065> >.

GROSS-LANGENHOFF, M. et al. cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. **J Biol Chem**, v. 281, n. 5, p. 2841-6, Feb 3 2006. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330539> >.

GROUSSIN, L. et al. Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 6, p. 1433-42, Dec 2002. ISSN 0002-9297 (Print)

0002-9297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424709> >.

GUDMUNDSSON, J. et al. Common sequence variants on 2p15 and Xp11.22 confer susceptibility to prostate cancer. **Nat Genet**, v. 40, n. 3, p. 281-3, Mar 2008. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264098> >.

GUDMUNDSSON, J. et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. **Nat Genet**, v. 39, n. 8, p. 977-83, Aug 2007. ISSN 1061-4036 (Print)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17603485> >.

HAFFNER, M. C. et al. Health-related quality-of-life outcomes after anatomic retroperitoneal radical prostatectomy in the phosphodiesterase type 5 ERA: impact of neurovascular bundle preservation. **Urology**, v. 66, n. 2, p. 371-6, Aug 2005. ISSN 1527-9995 (Electronic)

0090-4295 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040103> >.

HAIMAN, C. A. et al. Genome-wide association study of prostate cancer in men of African ancestry identifies a susceptibility locus at 17q21. **Nat Genet**, v. 43, n. 6, p. 570-3, Jun 2011. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602798> >.

HALPIN, D. M. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 3, n. 4, p. 543-61, 2008. ISSN 1176-9106 (Print)

1176-9106 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281073> >.

HAMID, A. R.; UMBAS, R.; MOCHTAR, C. A. Recent role of inflammation in prostate diseases: chemoprevention development opportunity. **Acta Med Indones**, v. 43, n. 1, p. 59-65, Jan 2011. ISSN 0125-9326 (Print)

0125-9326 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21339547> >.

HAMILTON, T. K. et al. Potential therapeutic applications of phosphodiesterase inhibition in prostate cancer. **World J Urol**, v. 31, n. 2, p. 325-30, Apr 2013. ISSN 1433-8726 (Electronic)

0724-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383129> >.

HANDA, N. et al. Crystal structure of the GAF-B domain from human phosphodiesterase 10A complexed with its ligand, cAMP. **J Biol Chem**, v. 283, n. 28, p. 19657-64, Jul 11 2008. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18477562> >.

HAYASHI, M. et al. Genomic organization, chromosomal localization, and alternative splicing of the human phosphodiesterase 8B gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 297, n. 5, p. 1253-8, Oct 11 2002. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372422> >.

HEDLUND, P. Nitric oxide/cGMP-mediated effects in the outflow region of the lower urinary tract--is there a basis for pharmacological targeting of cGMP? **World J Urol**, v. 23, n. 6, p. 362-7, Dec 2005. ISSN 0724-4983 (Print)

0724-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283327> >.

HEFTI, M. H. et al. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 6, p. 1198-208, Mar 2004. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009198> >.

HEIKAUS, C. C.; PANDIT, J.; KLEVIT, R. E. Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. **Structure**, v. 17, n. 12, p. 1551-7, Dec 9 2009. ISSN 1878-4186 (Electronic)

0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004158> >.

HERSZENYI, L. et al. The role of inflammation and proteinases in tumor progression. **Dig Dis**, v. 30, n. 3, p. 249-54, 2012. ISSN 1421-9875 (Electronic)

0257-2753 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722549> >.

HETMAN, J. M. et al. Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 1, p. 472-6, Jan 4 2000. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618442> >.

HOFFMANN, R. et al. cAMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 mutants which mimic activation and changes in rolipram inhibition triggered by protein kinase A phosphorylation of Ser-54: generation of a molecular model. **Biochem J**, v. 333 ( Pt 1), p. 139-49, Jul 1 1998. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639573> >.

HOOD, J.; GRANGER, H. J. Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 273, n. 36, p. 23504-8, Sep 4 1998. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722588> >.

HORVATH, A. et al. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. **Nat Genet**, v. 38, n. 7, p. 794-800, Jul 2006. ISSN 1061-4036 (Print)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16767104> >.

HORVATH, A. et al. Large deletions of the PRKAR1A gene in Carney complex. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 2, p. 388-95, Jan 15 2008. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18223213> >.

HORVATH, A. et al. A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. **Eur J Hum Genet**, v. 16, n. 10, p. 1245-53, Oct 2008. ISSN 1018-4813 (Print)

1018-4813 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431404> >.

HORVATH, A. et al. Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. **Cancer Res**, v. 69, n. 13, p. 5301-6, Jul 1 2009. ISSN 1538-7445 (Electronic)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19549888> >.

HOUSLAY, M. D. PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 69, p. 249-315, 2001. ISSN 0079-6603 (Print)

0079-6603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11550796> >.

HOUSLAY, M. D.; SULLIVAN, M.; BOLGER, G. B. The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. **Adv Pharmacol**, v. 44, p. 225-342, 1998. ISSN 1054-3589 (Print)

1054-3589 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547887> >.

HSIEH, I. S. et al. MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 3, p. 530-8, Mar 2013. ISSN 1460-2180 (Electronic)

0143-3334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23188675> >.

HU, H. et al. Mutant huntingtin affects the rate of transcription of striatum-specific isoforms of phosphodiesterase 10A. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 12, p. 3351-63, Dec 2004. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15610167> >.

HUAI, Q. et al. Three-dimensional structures of PDE4D in complex with roliprams and implication on inhibitor selectivity. **Structure**, v. 11, n. 7, p. 865-73, Jul 2003. ISSN 0969-2126 (Print)

0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842049> >.

HUAI, Q. et al. Crystal structure of phosphodiesterase 9 shows orientation variation of inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 26, p. 9624-9, Jun 29 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15210993> >.

HUANG, Y. S. et al. Unique features of PTCH1 mutation spectrum in Chinese sporadic basal cell carcinoma. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 27, n. 2, p. 235-41, Feb 2013. ISSN 1468-3083 (Electronic)

0926-9959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22313357> >.

HUNCHAREK, M. et al. Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. **Am J Public Health**, v. 100, n. 4, p. 693-701, Apr 2010. ISSN 1541-0048 (Electronic)

0090-0036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608952> >.

HUNTER, S. et al. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D306-12, Jan 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22096229> >.

INCA. Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil. **Rio de Janeiro: INCA**, p. 94p, 2007.

\_\_\_\_\_. Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. **Rio de Janeiro: INCA**, p. 122p, 2011.

INSTITUTE, E. B. ArrayExpress. [www.ebi.ac.uk/arrayexpress](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress), 2013. Acesso em: 13/02.

JAGER, R. et al. Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases. **J Biol Chem**, v. 287, n. 2, p. 1210-9, Jan 6 2012. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22105073> >.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer J Clin**, v. 59, n. 4, p. 225-49, Jul-Aug 2009. ISSN 0007-9235 (Print)

0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474385> >.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 5, p. 277-300, Sep-Oct 2010. ISSN 1542-4863 (Electronic)

0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610543> >.

JEON, K. I. et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated PDE1 regulates the beta-catenin/TCF signaling through PP2A B56 gamma subunit in proliferating vascular smooth muscle cells. **FEBS J**, v. 277, n. 24, p. 5026-39, Dec 2010. ISSN 1742-4658 (Electronic)

1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21078118> >.

JIA, J. et al. Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. **Nature**, v. 432, n. 7020, p. 1045-50, Dec 23 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616566> >.

JIN, S. L.; DING, S. L.; LIN, S. C. Phosphodiesterase 4 and its inhibitors in inflammatory diseases. **Chang Gung Med J**, v. 35, n. 3, p. 197-210, May-Jun 2012. ISSN 2072-0939 (Print)

2072-0939 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735051> >.

JOHNSON, L. M.; PRICE, D. K.; FIGG, W. D. Treatment-induced secretion of WNT16B promotes tumor growth and acquired resistance to chemotherapy: implications for potential use of inhibitors in cancer treatment. **Cancer Biol Ther**, v. 14, n. 2, p. 90-1, Feb 2013. ISSN 1555-8576 (Electronic)

1538-4047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114711> >.

JOSHI, C. N. et al. Control of vascular smooth muscle cell growth by connexin 43. **Front Physiol**, v. 3, p. 220, 2012. ISSN 1664-042X (Electronic)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22737133> >.

KANDA, N.; WATANABE, S. Regulatory roles of adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterases 1 and 4 in interleukin-13 production by activated human T cells. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 4, p. 495-507, Aug 15 2001. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448460> >.

KARAMI-TEHRANI, F.; FALLAHIAN, F.; ATRI, M. Expression of cGMP-dependent protein kinase, PKGIalpha, PKGIbeta, and PKGII in malignant and benign breast tumors. **Tumour Biol**, v. 33, n. 6, p. 1927-32, Dec 2012. ISSN 1423-0380 (Electronic)

1010-4283 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791569> >.

KARAMI-TEHRANI, F. et al. Evaluation of PDE5 and PDE9 expression in benign and malignant breast tumors. **Arch Med Res**, v. 43, n. 6, p. 470-5, Aug 2012. ISSN 1873-5487 (Electronic)

0188-4409 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960860> >.

KASHIWAGI, E. et al. Downregulation of phosphodiesterase 4B (PDE4B) activates protein kinase A and contributes to the progression of prostate cancer. **Prostate**, v. 72, n. 7, p. 741-51, May 15 2012. ISSN 1097-0045 (Electronic)

0270-4137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529021> >.

KE, H.; WANG, H. Crystal structures of phosphodiesterases and implications on substrate specificity and inhibitor selectivity. **Curr Top Med Chem**, v. 7, n. 4, p. 391-403, 2007. ISSN 1873-4294 (Electronic)

1568-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305581> >.

KEDIA, G. T. et al. The nitric oxide pathway in the human prostate: clinical implications in men with lower urinary tract symptoms. **World J Urol**, v. 26, n. 6, p. 603-9, Dec 2008. ISSN 0724-4983 (Print)

0724-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607596> >.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE) and peptide motifs. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 9, p. 1114-25, 2010. ISSN 1873-4286 (Electronic)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20030615> >.

KERR, N. M.; DANESH-MEYER, H. V. Phosphodiesterase inhibitors and the eye. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 37, n. 5, p. 514-23, Jul 2009. ISSN 1442-9071 (Electronic)

1442-6404 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19624350> >.

KIMURA, H.; MURAD, F. Increased particulate and decreased soluble guanylate cyclase activity in regenerating liver, fetal liver, and hepatoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 5, p. 1965-9, May 1975. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/239404> >.

KNIES, K. et al. Genotyping of fanconi anemia patients by whole exome sequencing: advantages and challenges. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52648, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285130> >.

KOBAYASHI, T. et al. Molecular comparison of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family: unique expression of PDE8B in rat brain. **Gene**, v. 319, p. 21-31, Nov 13 2003. ISSN 0378-1119 (Print)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597168> >.

KOTE-JARAI, Z. et al. Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study. **Nat Genet**, v. 43, n. 8, p. 785-91, Aug 2011. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21743467> >.

KOTERA, J. et al. Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. **Eur J Biochem**, v. 262, n. 3, p. 866-73, Jun 1999. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411650> >.

KUMAZOE, M. et al. 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis. **J Clin Invest**, v. 123, n. 2, p. 787-99, Feb 1 2013. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348740> >.

LAKICS, V.; KARRAN, E. H.; BOESS, F. G. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. **Neuropharmacology**, v. 59, n. 6, p. 367-74, Nov 2010. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493887> >.

LALA, P. K.; ORUCEVIC, A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. **Cancer Metastasis Rev**, v. 17, n. 1, p. 91-106, Mar 1998. ISSN 0167-7659 (Print)

0167-7659 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544425> >.

LARIZZA, L. et al. Developmental abnormalities and cancer predisposition in neurofibromatosis type 1. **Curr Mol Med**, v. 9, n. 5, p. 634-53, Jun 2009. ISSN 1875-5666 (Electronic)

1566-5240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601812> >.

LEE, D. I.; KASS, D. A. Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. **Physiology (Bethesda)**, v. 27, n. 4, p. 248-58, Aug 2012. ISSN 1548-9221 (Electronic)

1548-9221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22875455> >.

LEMAN, E. S.; GETZENBERG, R. H. Biomarkers for prostate cancer. **J Cell Biochem**, v. 108, n. 1, p. 3-9, Sep 1 2009. ISSN 1097-4644 (Electronic)

0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19507229> >.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D302-5, Jan 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053084> >.

LEVY, I. et al. Phosphodiesterase function and endocrine cells: links to human disease and roles in tumor development and treatment. **Curr Opin Pharmacol**, v. 11, n. 6, p. 689-97, Dec 2011. ISSN 1471-4973 (Electronic)

1471-4892 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047791> >.

LI, L.; YEE, C.; BEAVO, J. A. CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation. **Science**, v. 283, n. 5403, p. 848-51, Feb 5 1999. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9933169> >.

LIBE, R. et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 12, p. 4016-24, Jun 15 2008. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559625> >.

LIGIBEL, J. Lifestyle factors in cancer survivorship. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 30, p. 3697-704, Oct 20 2012. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23008316> >.

LIM, J.; PAHLKE, G.; CONTI, M. Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain. **J Biol Chem**, v. 274, n. 28, p. 19677-85, Jul 9 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391907> >.

LIN, C. S. et al. Regulation of human PDE5A2 intronic promoter by cAMP and cGMP: identification of a critical Sp1-binding site. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 280, n. 3, p. 693-9, Jan 26 2001. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11162576> >.

LIN, C. S. et al. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 27, p. 3439-57, 2006. ISSN 1873-4286 (Electronic)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17017938> >.

LINARI, M.; HANZAL-BAYER, M.; BECKER, J. The delta subunit of rod specific cyclic GMP phosphodiesterase, PDE delta, interacts with the Arf-like protein Arl3 in a GTP specific manner. **FEBS Lett**, v. 458, n. 1, p. 55-9, Sep 10 1999. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518933> >.

LINCOLN, T. M.; CORNWELL, T. L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. **FASEB J**, v. 7, n. 2, p. 328-38, Feb 1 1993. ISSN 0892-6638 (Print)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680013> >.

LINGLART, A. et al. PRKAR1A and PDE4D mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 12, p. E2328-38, Dec 2012. ISSN 1945-7197 (Electronic)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043190> >.

LIU, P. et al. Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. **Cancer Res**, v. 66, n. 8, p. 4011-9, Apr 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618720> >.

LOUGHNEY, K.; TAYLOR, J.; FLORIO, V. A. 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. **Int J Impot Res**, v. 17, n. 4, p. 320-5, Jul-Aug 2005. ISSN 0955-9930 (Print)

0955-9930 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800651> >.

LUEDDERS, D. W. et al. Role of cGMP in sildenafil-induced activation of endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 47, n. 3, p. 365-70, Mar 2006. ISSN 0160-2446 (Print)

0160-2446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633077> >.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacol Ther**, v. 109, n. 3, p. 366-98, Mar 2006. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102838> >.

LUKK, M. et al. A global map of human gene expression. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 4, p. 322-4, Apr 2010. ISSN 1546-1696 (Electronic)

1087-0156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20379172> >.

MA, L.; WANG, H. Y. Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca<sup>2+</sup> non-canonical pathway. **J Biol Chem**, v. 282, n. 39, p. 28980-90, Sep 28 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684012> >.

MACKENZIE, S. J. et al. ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH<sub>2</sub>-terminal UCR regions. **J Biol Chem**, v. 275, n. 22, p. 16609-17, Jun 2 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828059> >.

MANTOVANI, A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. **Curr Mol Med**, v. 10, n. 4, p. 369-73, Jun 2010. ISSN 1875-5666 (Electronic)

1566-5240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20455855> >.

MANTOVANI, G. et al. Different expression of protein kinase A (PKA) regulatory subunits in cortisol-secreting adrenocortical tumors: relationship with cell proliferation. **Exp Cell Res**, v. 314, n. 1, p. 123-30, Jan 1 2008. ISSN 0014-4827 (Print)

0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17904549> >.

MARTIN, R. M. Commentary: prostate cancer is omnipresent, but should we screen for it? **Int J Epidemiol**, v. 36, n. 2, p. 278-81, Apr 2007. ISSN 0300-5771 (Print)

0300-5771 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17567642> >.

MARTINS, J. A. et al. X-chromosome genetic variation in Sao Paulo State (Brazil) population. **Ann Hum Biol**, v. 37, n. 4, p. 598-603, Aug 2010. ISSN 1464-5033 (Electronic)

0301-4460 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113179> >.

MASCIARELLI, S. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 196-205, Jul 2004. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254586> >.

MATTHIESEN, K.; NIELSEN, J. Binding of cyclic nucleotides to phosphodiesterase 10A and 11A GAF domains does not stimulate catalytic activity. **Biochem J**, v. 423, n. 3, p. 401-9, Nov 1 2009. ISSN 1470- 8728 (Electronic)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19689430> >.

MCALLISTER-LUCAS, L. M. et al. An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. **J Biol Chem**, v. 270, n. 51, p. 30671-9, Dec 22 1995. ISSN 0021- 9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8530505> >.

MCLAUGHLIN, M. E. et al. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. **Nat Genet**, v. 4, n. 2, p. 130-4, Jun 1993. ISSN 1061-4036 (Print)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394174> >.

MEACCI, E. et al. Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 9, p. 3721-5, May 1 1992. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315035> >.

MENG, F. et al. Structure-based discovery of highly selective phosphodiesterase-9A inhibitors and implications for inhibitor design. **J Med Chem**, v. 55, n. 19, p. 8549-58, Oct 11 2012. ISSN 1520-4804 (Electronic)

0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985069> >.

MICHAELI, T. et al. Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 268, n. 17, p. 12925-32, Jun 15 1993. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389765> >.

MIKI, N. et al. Purification and properties of the light-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase of rod outer segments. **J Biol Chem**, v. 250, n. 16, p. 6320-7, Aug 25 1975. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/169236> >.

MIKI, T. et al. Characterization of the cDNA and gene encoding human PDE3B, the cGIP1 isoform of the human cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase family. **Genomics**, v. 36, n. 3, p. 476-85, Sep 15 1996. ISSN 0888-7543 (Print)

0888-7543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884271> >.

MILLER, D. C. et al. Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update from the National Cancer Data Base. **Cancer**, v. 98, n. 6, p. 1169-78, Sep 15 2003. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12973840> >.

MING, J. E. et al. Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. **Hum Genet**, v. 110, n. 4, p. 297-301, Apr 2002. ISSN 0340-6717 (Print)

0340-6717 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11941477> >.

MOON, E. Y. et al. Phosphodiesterase inhibitors control A172 human glioblastoma cell death through cAMP-mediated activation of protein kinase A and Epac1/Rap1 pathways. **Life Sci**, v. 90, n. 9-10, p. 373-80, Feb 27 2012. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227470> >.

MORITA, H. et al. Characterization of phosphodiesterase 2A in human malignant melanoma PMP cells. **Oncol Rep**, v. 29, n. 4, p. 1275-84, Apr 2013. ISSN 1791-2431 (Electronic)

1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23381931> >.

MUJOO, K. et al. Role of soluble guanylyl cyclase-cyclic GMP signaling in tumor cell proliferation. **Nitric Oxide**, v. 22, n. 1, p. 43-50, Jan 1 2010. ISSN 1089-8611 (Electronic)

1089-8603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19948239> >.

MURADOV, K. G.; GRANOVSKY, A. E.; ARTEMYEV, N. O. Mutation in rod PDE6 linked to congenital stationary night blindness impairs the enzyme inhibition by its gamma-subunit. **Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 3305-10, Mar 25 2003. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12641462> >.

NAGASAKI, S. et al. Phosphodiesterase type 9 (PDE9) in the human lower urinary tract: an immunohistochemical study. **BJU Int**, v. 109, n. 6, p. 934-40, Mar 2012. ISSN 1464-410X (Electronic)

1464-4096 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21736695> >.

NAGEL, D. J. et al. Role of nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1A in vascular smooth muscle cell growth and survival. **Circ Res**, v. 98, n. 6, p. 777-84, Mar 31 2006. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16514069> >.

NETHERTON, S. J.; MAURICE, D. H. Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis. **Mol Pharmacol**, v. 67, n. 1, p. 263-72, Jan 2005. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475573> >.

NG, P. C.; KIRKNESS, E. F. Whole genome sequencing. **Methods Mol Biol**, v. 628, p. 215-26, 2010. ISSN 1940-6029 (Electronic)

1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20238084> >.

NICLIS, C. et al. Dietary habits and prostate cancer prevention: a review of observational studies by focusing on South America. **Nutr Cancer**, v. 64, n. 1, p. 23-33, 2012. ISSN 1532-7914 (Electronic)

0163-5581 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136636> >.

NIKOLOVA, S. et al. Phosphodiesterase 6 subunits are expressed and altered in idiopathic pulmonary fibrosis. **Respir Res**, v. 11, p. 146, 2010. ISSN 1465-993X (Electronic)

1465-9921 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20979602> >.

O'DANIEL, J. M.; LEE, K. Whole-genome and whole-exome sequencing in hereditary cancer: impact on genetic testing and counseling. **Cancer J**, v. 18, n. 4, p. 287-92, Jul-Aug 2012. ISSN 1540-336X (Electronic)

1528-9117 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22846728> >.

OLIVA, A. A., JR. et al. Phosphodiesterase isoform-specific expression induced by traumatic brain injury. **J Neurochem**, v. 123, n. 6, p. 1019-29, Dec 2012. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23057870> >.

PAGE, C. P.; SPINA, D. Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. **Handb Exp Pharmacol**, n. 204, p. 391-414, 2011. ISSN 0171-2004 (Print)

0171-2004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21695650> >.

PATRUCCO, E. et al. Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 49, n. 2, p. 330-3, Aug 2010. ISSN 1095-8584 (Electronic)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353794> >.

PATRUNO, A. et al. Novel aminobenzyl-acetamidine derivative modulate the differential regulation of NOSs in LPS induced inflammatory response: role of PI3K/Akt pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1820, n. 12, p. 2095-104, Dec 2012. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951221> >.

PENNEY, K. L. et al. Evaluation of 8q24 and 17q risk loci and prostate cancer mortality. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 9, p. 3223-30, May 1 2009. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366828> >.

PIRI, N. et al. A substitution of G to C in the cone cGMP-phosphodiesterase gamma subunit gene found in a distinctive form of cone dystrophy. **Ophthalmology**, v. 112, n. 1, p. 159-66, Jan 2005. ISSN 1549- 4713 (Electronic)

0161-6420 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629837> >.

POLASCIO, T. J.; OESTERLING, J. E.; PARTIN, A. W. Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. **J Urol**, v. 162, n. 2, p. 293-306, Aug 1999. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411025> >.

POZUELO RUBIO, M. et al. Phosphodiesterase 3A binds to 14-3-3 proteins in response to PMA-induced phosphorylation of Ser428. **Biochem J**, v. 392, n. Pt 1, p. 163-72, Nov 15 2005. ISSN 1470-8728 (Electronic)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153182> >.

PULLAMSETTI, S. S. et al. Phosphodiesterase-4 promotes proliferation and angiogenesis of lung cancer by crosstalk with HIF. **Oncogene**, v. 32, n. 9, p. 1121-34, Feb 28 2013. ISSN 1476-5594 (Electronic)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22525277> >.

PUNTA, M. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D290-301, Jan 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127870> >.

PYRIOCHOU, A. et al. The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil stimulates angiogenesis through a protein kinase G/MAPK pathway. **J Cell Physiol**, v. 211, n. 1, p. 197-204, Apr 2007. ISSN 0021-9541 (Print)

0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17226792> >.

REED, T. M. et al. Phosphodiesterase 1B knock-out mice exhibit exaggerated locomotor hyperactivity and DARPP-32 phosphorylation in response to dopamine agonists and display impaired spatial learning. **J Neurosci**, v. 22, n. 12, p. 5188-97, Jun 15 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077213> >.

RENEERKENS, O. A. et al. Inhibition of phosphodiesterase type 2 or type 10 reverses object memory deficits induced by scopolamine or MK-801. **Behav Brain Res**, v. 236, n. 1, p. 16-22, Jan 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951181> >.

RENTERO, C.; MONFORT, A.; PUIGDOMENECH, P. Identification and distribution of different mRNA variants produced by differential splicing in the human phosphodiesterase 9A gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 301, n. 3, p. 686-92, Feb 14 2003. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12565835> >.

RIBEIRO, M. L. et al. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 2, p. 205-13, Feb 2002. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847524> >.

RIDGE, K. D. et al. Phototransduction: crystal clear. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 9, p. 479-87, Sep 2003. ISSN 0968-0004 (Print)

0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678959> >.

ROBINSON-WHITE, A. et al. Protein kinase-A activity in PRKAR1A-mutant cells, and regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 13, p. 1475-84, Jul 1 2003. ISSN 0964-6906 (Print)

0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12812976> >.

RODEFER, J. S.; MURPHY, E. R.; BAXTER, M. G. PDE10A inhibition reverses subchronic PCP-induced deficits in attentional set-shifting in rats. **Eur J Neurosci**, v. 21, n. 4, p. 1070-6, Feb 2005. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15787711> >.

ROMAGNOLO, D. F.; SELMIN, O. I. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. **J Nutr Gerontol Geriatr**, v. 31, n. 3, p. 206-38, 2012. ISSN 2155-1200 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22888839> >.

RYAN, M. et al. LS-SNP/PDB: annotated non-synonymous SNPs mapped to Protein Data Bank structures. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1431-2, Jun 1 2009. ISSN 1367-4811 (Electronic)

1367-4811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369493> >.

RYBALKIN, S. D. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. **Circ Res**, v. 90, n. 2, p. 151-7, Feb 8 2002. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834707> >.

SACCO, E. et al. Familial and hereditary prostate cancer by definition in an italian surgical series: clinical features and outcome. **Eur Urol**, v. 47, n. 6, p. 761-8, Jun 2005. ISSN 0302-2838 (Print)

0302-2838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925070> >.

SAKR, W. A. et al. Age and racial distribution of prostatic intraepithelial neoplasia. **Eur Urol**, v. 30, n. 2, p. 138-44, 1996. ISSN 0302-2838 (Print)

0302-2838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8875194> >.

SAKR, W. A. et al. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. **J Urol**, v. 150, n. 2 Pt 1, p. 379-85, Aug 1993. ISSN 0022-5347 (Print)

0022-5347 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8326560> >.

SALVEMINI, D.; KIM, S. F.; MOLLACE, V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 7, p. R473-87, Apr 2013. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389111> >.

SARWAR, M. et al. Protein kinase A (PKA) pathway is functionally linked to androgen receptor (AR) in the progression of prostate cancer. **Urol Oncol**, Feb 12 2013. ISSN 1873-2496 (Electronic)

1078-1439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410945> >.

SAUNA, Z. E.; KIMCHI-SARFATY, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 10, p. 683-91, Oct 2011. ISSN 1471-0064 (Electronic)

1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878961> >.

SCHERMULY, R. T. et al. Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. **Circulation**, v. 115, n. 17, p. 2331-9, May 1 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438150> >.

SEEGER, T. F. et al. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. **Brain Res**, v. 985, n. 2, p. 113-26, Sep 26 2003. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967715> >.

SHAKUR, Y. et al. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 66, p. 241-77, 2001. ISSN 0079-6603 (Print)

0079-6603 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051766> >.

SHIMIZU-MATSUMOTO, A. et al. Isolation and chromosomal localization of the human cone cGMP phosphodiesterase gamma cDNA (PDE6H). **Genomics**, v. 32, n. 1, p. 121-4, Feb 15 1996. ISSN 0888-7543 (Print)

0888-7543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786098> >.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 62, n. 1, p. 10-29, Jan-Feb 2012. ISSN 1542-4863 (Electronic)

0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237781> >.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 4, p. 212-36, Jul-Aug 2011. ISSN 1542-4863 (Electronic)

0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21685461> >.

SKERKER, J. M. et al. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. **PLoS Biol**, v. 3, n. 10, p. e334, Oct 2005. ISSN 1545- 7885 (Electronic)

1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176121> >.

SMITH, J. R. et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1371-4, Nov 22 1996. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910276> >.

SMITH, S. J. et al. Ubiquitous expression of phosphodiesterase 7A in human proinflammatory and immune cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 284, n. 2, p. L279-89, Feb 2003. ISSN 1040-0605 (Print)

1040-0605 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388353> >.

SONNENBURG, W. K. et al. Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. **J Biol Chem**, v. 270, n. 52, p. 30989-1000, Dec 29 1995. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8537356> >.

STASIEWICZ, D. et al. [Epidemiology and risk factors of the prostate cancer]. **Pol Merkur Lekarski**, v. 33, n. 195, p. 163-7, Sep 2012. ISSN 1426-9686 (Print)

1426-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23157136> >.

STRATAKIS, C. A. Cyclic AMP, protein kinase A, and phosphodiesterases: proceedings of an international workshop. **Horm Metab Res**, v. 44, n. 10, p. 713-5, Sep 2012. ISSN 1439-4286 (Electronic)

0018-5043 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951901> >.

STRATAKIS, C. A.; KIRSCHNER, L. S. Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro- and macronodular disease) leading to Cushing syndrome. **Horm Metab Res**, v. 30, n. 6-7, p. 456-63, Jun-Jul 1998. ISSN 0018-5043 (Print)

0018-5043 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694579> >.

STRATAKIS, C. A.; KIRSCHNER, L. S.; CARNEY, J. A. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 9, p. 4041-6, Sep 2001. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549623> >.

STRYER, L. Vision: from photon to perception. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 2, p. 557-9, Jan 23 1996. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254392> >.

SU, A. I. et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 16, p. 6062-7, Apr 20 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075390> >.

SUN, J. et al. Association between sequence variants at 17q12 and 17q24.3 and prostate cancer risk in European and African Americans. **Prostate**, v. 68, n. 7, p. 691-7, May 15 2008. ISSN 0270-4137 (Print)

0270-4137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18361410> >.

SUNKEL, B.; WANG, Q. Mapping mutations in prostate cancer exomes. **Asian J Androl**, v. 14, n. 6, p. 801-2, Nov 2012. ISSN 1745-7262 (Electronic)

1008-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842706> >.

SUZUKI, S. et al. Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19534, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21611185> >.

TAKATA, R. et al. Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. **Nat Genet**, v. 42, n. 9, p. 751-4, Sep 2010. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676098> >.

TANG, K. M.; JANG, E. K.; HASLAM, R. J. Expression and mutagenesis of the catalytic domain of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3) cloned from human platelets. **Biochem J**, v. 323 ( Pt 1), p. 217-24, Apr 1 1997. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9173884> >.

TASKEN, K. et al. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res**, v. 31, p. 191-204, 1997. ISSN 1040-7952 (Print)

1040-7952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9344252> >.

THOMPSON, I. M. et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$  4.0 ng per milliliter. **N Engl J Med**, v. 350, n. 22, p. 2239-46, May 27 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163773> >.

TORTORA, G. et al. The RI alpha subunit of protein kinase A controls serum dependency and entry into cell cycle of human mammary epithelial cells. **Oncogene**, v. 9, n. 11, p. 3233-40, Nov 1994. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7936647> >.

TRAKA, M. et al. Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2568, 2008. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18596959> >.

TSUNODA, T. et al. Inhibition of phosphodiesterase-4 (PDE4) activity triggers luminal apoptosis and AKT dephosphorylation in a 3-D colonic-crypt model. **Mol Cancer**, v. 11, p. 46, 2012. ISSN 1476-4598 (Electronic)

1476-4598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22830422> >.

TURKO, I. V.; FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. **Biochem J**, v. 329 ( Pt 3), p. 505-10, Feb 1 1998. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445376> >.

TUTEJA, N. et al. Isolation and characterization of cDNA encoding the gamma-subunit of cGMP phosphodiesterase in human retina. **Gene**, v. 88, n. 2, p. 227-32, Apr 16 1990. ISSN 0378-1119 (Print)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2161380> >.

UCHIDA, C. et al. The role of Sp1 and AP-2 in basal and protein kinase A--induced expression of mitochondrial serine:pyruvate aminotransferase in hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 42, p. 39082-92, Oct 18 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169688> >.

UNIPROT, C. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D71-5, Jan 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22102590> >.

VASTA, V.; SHIMIZU-ALBERGINE, M.; BEAVO, J. A. Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 52, p. 19925-30, Dec 26 2006. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172443> >.

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 26, p. 3831-52, 2012. ISSN 1873-4286 (Electronic)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632748> >.

VEZZOSI, D. et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) gene defects in patients with acth-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH): functional variants may contribute to genetic susceptibility of bilateral adrenal tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 11, p. E2063-9, Nov 2012. ISSN 1945-7197 (Electronic)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996146> >.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-58, Mar 29 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539594> >.

WALSH, T. J. Male reproductive health and prostate cancer risk. **Curr Opin Urol**, v. 21, n. 6, p. 506-13, Nov 2011. ISSN 1473-6586 (Electronic)

0963-0643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21941182> >.

WANG, G. et al. Identification of genes targeted by the androgen and PKA signaling pathways in prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 25, n. 55, p. 7311-23, Nov 23 2006. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751804> >.

WANG, H.; LEE, Y.; MALBON, C. C. PDE6 is an effector for the Wnt/Ca<sup>2+</sup>/cGMP-signalling pathway in development. **Biochem Soc Trans**, v. 32, n. Pt 5, p. 792-6, Nov 2004. ISSN 0300-5127 (Print)

0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494017> >.

WANG, P. et al. Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution. **Gene**, v. 280, n. 1-2, p. 183-94, Dec 12 2001. ISSN 0378-1119 (Print)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738832> >.

WHEELER, M. A. et al. Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract. **J Smooth Muscle Res**, v. 41, n. 1, p. 1-21, Feb 2005. ISSN 0916-8737 (Print)

0916-8737 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855736> >.

WOMACK, J. E.; JANG, H. J.; LEE, M. O. Genomics of complex traits. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1271, p. 33-6, Oct 2012. ISSN 1749-6632 (Electronic)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23050961> >.

WONG, J. C.; BATHINA, M.; FISCUS, R. R. Cyclic GMP/protein kinase G type-lalpha (PKG-lalpha) signaling pathway promotes CREB phosphorylation and maintains higher c-IAP1, livin, survivin, and Mcl-1 expression and the inhibition of PKG-lalpha kinase activity synergizes with cisplatin in non-small cell lung cancer cells. **J Cell Biochem**, v. 113, n. 11, p. 3587-98, Nov 2012. ISSN 1097-4644 (Electronic)

0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740515> >.

WUNDER, F. et al. Characterization of the first potent and selective PDE9 inhibitor using a cGMP reporter cell line. **Mol Pharmacol**, v. 68, n. 6, p. 1775-81, Dec 2005. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150925> >.

YAN, C. et al. The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner. **J Biol Chem**, v. 271, n. 41, p. 25699-706, Oct 11 1996. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810348> >.

YANG, C. S.; WANG, H. Cancer therapy combination: green tea and a phosphodiesterase 5 inhibitor? **J Clin Invest**, v. 123, n. 2, p. 556-8, Feb 1 2013. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348734> >.

YANG, S. W. et al. Discovery of orally active pyrazoloquinolines as potent PDE10 inhibitors for the management of schizophrenia. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 22, n. 1, p. 235-9, Jan 1 2012. ISSN 1464-3405 (Electronic)

0960-894X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142545> >.

YAO, S. Y.; NATARAJAN, C.; SRIRAM, S. nNOS mediated mitochondrial injury in LPS stimulated oligodendrocytes. **Mitochondrion**, v. 12, n. 2, p. 336-44, Mar 2012. ISSN 1872-8278 (Electronic)

1567-7249 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22289618> >.

YEAGER, M. et al. Identification of a new prostate cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. **Nat Genet**, v. 41, n. 10, p. 1055-7, Oct 2009. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767755> >.

YU, Y. et al. Exome and whole-genome sequencing as clinical tests: a transformative practice in molecular diagnostics. **Clin Chem**, v. 58, n. 11, p. 1507-9, Nov 2012. ISSN 1530-8561 (Electronic)

0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065473> >.

YUASA, K. et al. Genomic organization of the human phosphodiesterase PDE11A gene. Evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 1, p. 168-78, Jan 2001. ISSN 0014-2956 (Print)

0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121118> >.

YUASA, K. et al. Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. **J Biol Chem**, v. 275, n. 40, p. 31469-79, Oct 6 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906126> >.

ZHANG, L. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase profiling reveals increased expression of phosphodiesterase 7B in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 49, p. 19532-7, Dec 9 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033455> >.

ZHANG, T. et al. Inhibitory effects and underlying mechanism of 7-hydroxyflavone phosphate ester in HeLa cells. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36652, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22574207> >.

ZHANG, X. J. et al. Direct allosteric regulation between the GAF domain and catalytic domain of photoreceptor phosphodiesterase PDE6. **J Biol Chem**, v. 283, n. 44, p. 29699-705, Oct 31 2008. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779324> >.

ZHAO, A. Z. et al. A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 8, p. 727-8, Aug 2002. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101402> >.

ZHAO, Z. et al. Reduced glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1359, n. 2, p. 143-52, Nov 27 1997. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409811> >.

ZHONG, Z. D. et al. NF-Y and Sp1 cooperate for the transcriptional activation and cAMP response of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **J Biol Chem**, v. 275, n. 24, p. 18602-10, Jun 16 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764764> >.

ZHU, H. et al. Restoring soluble guanylyl cyclase expression and function blocks the aggressive course of glioma. **Mol Pharmacol**, v. 80, n. 6, p. 1076-84, Dec 2011. ISSN 1521-0111 (Electronic)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908708> >.

ZORAGHI, R. et al. Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. **J Biol Chem**, v. 280, n. 12, p. 12051-63, Mar 25 2005. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677448> >.

8. APÊNDICES

8.1 APÊNDICE 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE PACIENTES E POPULAÇÃO MUNDIAL

Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance
PDE1A	rs3754929	Allelic Frequency	ALL	1	1503 (68,81%)	p=0,446 OR - 1,32 (95% CI, 0,64-2,72)	PDE6A	rs2277925	Allelic Frequency	ALL	2	1655 (75,77%)	p=0,146 OR - 0,44 (95% CI, 0,15-1,28)
			3	681 (31,18%)	3					529 (24,22%)			
			PRS	1	20 (62,5%)					2	28 (87,5%)		
			3	12 (37,5%)					3	4 (12,5%)			
PDE1A	rs3754929	Genotype Frequency	ALL	11	521 (47,71%)	p=0,269	PDE6A	rs2277925	Genotype Frequency	ALL	22	640 (58,60%)	p=0,125
			33	110 (10,07%)	33					77 (7,051%)			
			13	461 (42,21%)	23					375 (34,34%)			
			11	5 (31,25%)				22	13 (81,25%)				
			33	1 (6,25%)				33	1 (6,25%)				
			13	10 (62,5%)				23	2 (12,5%)				
PDE1A	rs67483153	Allelic Frequency	ALL	1	115 (5,265%)	p=0,684 OR - 0,83 (95% CI, 0,19-3,53)	PDE6A	rs2277926	Allelic Frequency	ALL	1	471 (21,56%)	p=0,126 OR - 2,65 (95% CI, 0,80-8,76)
			3	2069 (94,73%)	3					1713 (78,43%)			
			PRS	1	2 (6,25%)					1	3 (9,375%)		
			3	30 (93,75%)				3	29 (90,62%)				
PDE1A	rs67483153	Genotype Frequency	ALL	11	5 (0,457%)	p=0,869	PDE6A	rs2277926	Genotype Frequency	ALL	11	58 (5,311%)	p=0,038
			33	982 (89,92%)	33					679 (62,17%)			
			13	105 (9,615%)	13					355 (32,50%)			
			11	0 (0%)				11	1 (6,25%)				
			33	14 (87,5%)				33	14 (87,5%)				
			13	2 (12,5%)				13	1 (6,25%)				
PDE1B	rs1249950	Allelic Frequency	ALL	2	1156 (52,93%)	p=0,858 OR - 1,12 (95% CI, 0,55-2,26)	PDE6A	rs75282782	Allelic Frequency	ALL	3	2143 (98,12%)	p=0,460 OR - 1,68 (95% CI, 0,22-12,6)
			4	1028 (47,06%)	4					41 (1,877%)			
			PRS	2	16 (50%)					3	31 (96,87%)		
			4	16 (50%)				4	1 (3,125%)				
PDE1B	rs1249950	Genotype Frequency	ALL	22	313 (28,66%)	p=0,008	PDE6A	rs75282782	Genotype Frequency	ALL	33	1051 (96,24%)	p=0,463 OR - 1,70 (95% CI, 0,22-13,2)
			44	249 (22,80%)	44					0 (0%)			
			24	530 (48,53%)	34					41 (3,754%)			
			22	7 (43,75%)				33	15 (93,75%)				
			44	7 (43,75%)				44	0 (0%)				
			24	2 (12,5%)				34	1 (6,25%)				
PDE1C	rs113385926	Allelic Frequency	ALL	2	2082 (95,32%)	p=1 OR - 0,65 (95% CI, 0,08-4,87)	PDE6A	rs76082232	Allelic Frequency	ALL	2	2077 (95,10%)	p=0,669 OR - 1,29 (95% CI, 0,30-5,48)
			4	102 (4,670%)	4					107 (4,899%)			
			PRS	2	31 (96,87%)					2	30 (93,75%)		
			4	1 (3,125%)				4	2 (6,25%)				
PDE1C	rs113385926	Genotype Frequency	ALL	22	994 (91,02%)	p=0,886	PDE6A	rs76082232	Genotype Frequency	ALL	22	991 (90,75%)	p=0,809
			44	4 (0,366%)	44					6 (0,549%)			
			24	94 (8,608%)	24					95 (8,699%)			
			22	15 (93,75%)				22	14 (87,5%)				
			44	0 (0%)				44	0 (0%)				
			24	1 (6,25%)				24	2 (12,5%)				
PDE1C	rs115957738	Allelic Frequency	ALL	1	13 (0,595%)	p=0,184 OR - 0,18 (95% CI, 0,02-1,46)	PDE6B	rs115775983	Allelic Frequency	ALL	1	17 (0,778%)	p=0,029 OR - 0,11 (95% CI, 0,02-0,53)
			3	2171 (99,40%)	3					2167 (99,22%)			
			PRS	1	1 (3,125%)					1	2 (6,25%)		
			3	31 (96,87%)				3	30 (93,75%)				
PDE1C	rs115957738	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,185 OR - 0,18 (95% CI, 0,02-1,47)	PDE6B	rs115775983	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,028 OR - 0,11 (95% CI, 0,02-0,52)
			33	1079 (98,80%)	33					1075 (98,44%)			
			13	13 (1,190%)	13					17 (1,556%)			
			11	0 (0%)				11	0 (0%)				
			33	15 (93,75%)				33	14 (87,5%)				
			13	1 (6,25%)				13	2 (12,5%)				
PDE1C	rs116449276	Allelic Frequency	ALL	2	8 (0,366%)	p=0,008 OR - 0,05 (95% CI, 0,01-0,27)	PDE6B	rs147482093	Allelic Frequency	ALL	1	6 (0,274%)	p=0,096 OR - 0,08 (95% CI, 0,00-0,73)
			4	2176 (99,63%)	3					2178 (99,72%)			
			PRS	2	2 (6,25%)					1	1 (3,125%)		
			4	30 (93,75%)				3	31 (96,87%)				
PDE1C	rs116449276	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=0,008 OR - 0,05 (95% CI, 0,01-0,26)	PDE6B	rs147482093	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,097 OR - 0,08 (95% CI, 0,00-0,73)
			44	1084 (99,26%)	33					1086 (99,45%)			
			24	8 (0,732%)	13					6 (0,549%)			
			22	0 (0%)				11	0 (0%)				
			44	14 (87,5%)				33	15 (93,75%)				
			24	2 (12,5%)				13	1 (6,25%)				
PDE1C	rs117088924	Allelic Frequency	ALL	1	2158 (98,80%)	p=0,326 OR - 2,67 (95% CI, 0,35-20,3)	PDE6B	rs61734864	Allelic Frequency	ALL	1	2167 (99,22%)	p=0,231 OR - 4,11 (95% CI, 0,53-31,8)
			2	26 (1,190%)	3					17 (0,778%)			
			PRS	1	31 (96,87%)					1	31 (96,87%)		
			2	1 (3,125%)				3	1 (3,125%)				
PDE1C	rs117088924	Genotype Frequency	ALL	11	1066 (97,61%)	p=0,327 OR - 2,73 (95% CI, 0,34-21,4)	PDE6B	rs61734864	Genotype Frequency	ALL	11	1076 (98,53%)	p=0,473
			22	0 (0%)	33					1 (0,091%)			
			12	26 (2,380%)	13					15 (1,373%)			
			11	15 (93,75%)				11	15 (93,75%)				
			22	0 (0%)				33	0 (0%)				
			12	1 (6,25%)				13	1 (6,25%)				
PDE1C	rs1860790	Allelic Frequency	ALL	1	2087 (95,55%)	p=1 OR - 0,69 (95% CI, 0,09-5,13)	PDE6B	rs61760239	Allelic Frequency	ALL	1	59 (2,701%)	p=0,058 OR - 0,26 (95% CI, 0,07-0,90)
			3	97 (4,441%)	4					2125 (97,29%)			
			PRS	1	31 (96,87%)					1	3 (9,375%)		
			3	1 (3,125%)				4	29 (90,62%)				
PDE1C	rs1860790	Genotype Frequency	ALL	11	997 (91,30%)	p=0,916	PDE6B	rs61760239	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,055 OR - 0,06 (95% CI, 0,06-0,89)
			33	2 (0,183%)	44					1033 (94,59%)			
			13	93 (8,516%)	14					59 (5,402%)			
			11	15 (93,75%)				11	0 (0%)				
			33	0 (0%)				44	13 (81,25%)				
			13	1 (6,25%)				14	3 (18,75%)				

Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance
PDE1C	rs2302450	Allelic Frequency	ALL	1 3	495 (22,66%) 1689 (77,33%)	p=0,999 OR - 1,04 (95% CI, 0,45-2,43)	PDE6B	rs73058408	Allelic Frequency	ALL	1 3	0 (0%) 2184 (100%)	p=0,014 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)
			PRS	1 3	7 (21,87%) 25 (78,12%)					PRS	1 3	1 (3,125%) 31 (96,87%)	
PDE1C	rs2302450	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	53 (4,853%) 650 (59,52%) 389 (35,62%)	p=0,397	PDE6B	rs73058408	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	0 (0%) 1092 (100%) 0 (0%)	p=0,014 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)
			PRS	11 33 13	0 (0%) 9 (56,25%) 7 (43,75%)					PRS	11 33 13	0 (0%) 15 (93,75%) 1 (6,25%)	
PDE1C	rs3213709	Allelic Frequency	ALL	1 3	1757 (80,44%) 427 (19,55%)	p=0,999 OR - 0,94 (95% CI, 0,38-2,32)	PDE6C	rs11187564	Allelic Frequency	ALL	2 4	119 (5,448%) 2065 (94,55%)	p=1 OR -1,78 (95% CI, 0,24- 13,1)
			PRS	1 3	26 (81,25%) 6 (18,75%)					PRS	2 4	1 (3,125%) 31 (96,87%)	
PDE1C	rs3213709	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	705 (64,56%) 40 (3,663%) 347 (31,77%)	p=0,514	PDE6C	rs11187564	Genotype Frequency	ALL	22 44 24	5 (0,457%) 978 (89,56%) 109 (9,981%)	p=0,806
			PRS	11 33 13	10 (62,5%) 0 (0%) 6 (37,5%)					PRS	22 44 24	0 (0%) 15 (93,75%) 1 (6,25%)	
PDE1C	rs61729940	Allelic Frequency	ALL	1 3	255 (11,67%) 1929 (88,32%)	p=0,574 OR - 1,98 (95% CI, 0,47-8,34)	PDE6C	rs1409332	Allelic Frequency	ALL	1 4	960 (43,95%) 1224 (56,04%)	p=0,857 OR - 0,88 (95% CI, 0,44-1,78)
			PRS	1 3	2 (6,25%) 30 (93,75%)					PRS	1 4	15 (46,87%) 17 (53,12%)	
PDE1C	rs61729940	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	24 (2,197%) 861 (78,84%) 207 (18,95%)	p=0,538	PDE6C	rs1409332	Genotype Frequency	ALL	11 44 14	248 (22,71%) 380 (34,79%) 464 (42,49%)	p=0,951
			PRS	11 33 13	0 (0%) 14 (87,5%) 2 (12,5%)					PRS	11 44 14	4 (25%) 5 (31,25%) 7 (43,75%)	
PDE1C	rs61736729	Allelic Frequency	ALL	3 4	9 (0,412%) 2175 (99,58%)	p=0,135 OR - 0,12 (95% CI, 0,01-1,04)	PDE6C	rs182445749	Allelic Frequency	ALL	1 3	2178 (99,72%) 6 (0,274%)	p=0,096 OR - 0,14 (95% CI, 1,36-100,)
			PRS	3 4	1 (3,125%) 31 (96,87%)					PRS	1 3	31 (96,87%) 1 (3,125%)	
PDE1C	rs61736729	Genotype Frequency	ALL	33 44 34	0 (0%) 1083 (99,17%) 9 (0,824%)	p=0,135 OR - 0,12 (95% CI, 0,01-1,04)	PDE6C	rs182445749	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	1086 (99,45%) 0 (0%) 6 (0,549%)	p=0,097 OR - 12,0 (95% CI, 1,36-106,)
			PRS	33 44 34	0 (0%) 15 (93,75%) 1 (6,25%)					PRS	11 33 13	15 (93,75%) 0 (0%) 1 (6,25%)	
PDE1C	rs61745829	Allelic Frequency	ALL	2 4	2164 (99,08%) 20 (0,915%)	p=0,264 OR - 3,49 (95% CI, 0,45-26,8)	PDE6C	rs193276411	Allelic Frequency	ALL	1 3	10 (0,457%) 2174 (99,54%)	p=0,148 OR - 0,14 (95% CI, 0,01-1,14)
			PRS	2 4	31 (96,87%) 1 (3,125%)					PRS	1 3	1 (3,125%) 31 (96,87%)	
PDE1C	rs61745829	Genotype Frequency	ALL	22 44 24	1072 (98,16%) 0 (0%) 20 (1,831%)	p=0,265 OR - 3,57 (95% CI, 0,44-28,3)	PDE6C	rs193276411	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	0 (0%) 1082 (99,08%) 10 (0,915%)	p=0,148 OR - 0,13 (95% CI, 0,01-1,15)
			PRS	22 44 24	15 (93,75%) 0 (0%) 1 (6,25%)					PRS	11 33 13	0 (0%) 15 (93,75%) 1 (6,25%)	
PDE1C	rs73690312	Allelic Frequency	ALL	1 3	2081 (95,28%) 103 (4,716%)	p=0,999 OR - 0,65 (95% CI, 0,08-4,82)	PDE6C	rs3737228	Allelic Frequency	ALL	3 4	603 (27,60%) 1581 (72,39%)	p=0,112 OR - 0,55 (95% CI, 0,27-1,13)
			PRS	1 3	31 (96,87%) 1 (3,125%)					PRS	3 4	13 (40,62%) 19 (59,37%)	
PDE1C	rs73690312	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	993 (90,93%) 4 (0,366%) 95 (8,699%)	p=0,882	PDE6C	rs3737228	Genotype Frequency	ALL	33 44 34	101 (9,249%) 590 (54,02%) 401 (36,72%)	p=0,321
			PRS	11 33 13	15 (93,75%) 0 (0%) 1 (6,25%)					PRS	33 44 34	3 (18,75%) 6 (37,5%) 7 (43,75%)	
PDE1C	rs76290787	Allelic Frequency	ALL	1 3	20 (0,915%) 2164 (99,08%)	p=0,264 OR - 0,28 (95% CI, 0,03-2,20)	PDE6C	rs45522236	Allelic Frequency	ALL	2 3	6 (0,274%) 2178 (99,72%)	p=0,096 OR - 0,08 (95% CI, 0,00-0,73)
			PRS	1 3	1 (3,125%) 31 (96,87%)					PRS	2 3	1 (3,125%) 31 (96,87%)	
PDE1C	rs76290787	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	0 (0%) 1072 (98,16%) 20 (1,831%)	p=0,265 OR - 0,27 (95% CI, 0,03-2,22)	PDE6C	rs45522236	Genotype Frequency	ALL	22 33 23	0 (0%) 1086 (99,45%) 6 (0,549%)	p=0,097 OR - 0,08 (95% CI, 0,00-0,73)
			PRS	11 33 13	0 (0%) 15 (93,75%) 1 (6,25%)					PRS	22 33 23	0 (0%) 15 (93,75%) 1 (6,25%)	
PDE1C	rs78021925	Allelic Frequency	ALL	1 2	2144 (98,16%) 40 (1,831%)	p=0,452 OR - 1,72 (95% CI, 0,23-12,9)	PDE6C	rs616522	Allelic Frequency	ALL	1 3	645 (29,53%) 1539 (70,46%)	p=0,846 OR - 0,92 (95% CI, 0,43-1,95)
			PRS	1 2	31 (96,87%) 1 (3,125%)					PRS	1 3	10 (31,25%) 22 (68,75%)	
PDE1C	rs78021925	Genotype Frequency	ALL	11 22 12	1055 (96,61%) 3 (0,274%) 34 (3,113%)	p=0,785	PDE6C	rs616522	Genotype Frequency	ALL	11 33 13	104 (9,523%) 551 (50,45%) 437 (40,01%)	p=0,700
			PRS	11 22 12	15 (93,75%) 0 (0%) 1 (6,25%)					PRS	11 33 13	1 (6,25%) 7 (43,75%) 8 (50%)	
PDE2A	rs1135029	Allelic Frequency	ALL	2 4	1484 (67,94%) 700 (32,05%)	p=0,086 OR - 1,87 (95% CI, 0,92-3,76)	PDE6C	rs701865	Allelic Frequency	ALL	1 2	935 (42,81%) 1249 (57,18%)	p=0,473 OR - 0,74 (95% CI, 0,37-1,50)
			PRS	2 4	17 (53,12%) 15 (46,87%)					PRS	1 2	16 (50%) 16 (50%)	



Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance
PDE3A	rs71539448	Allelic Frequency	ALL	1	166 (7,600%)	p=1 OR - 1,23 (95% CI, 0,29-5,20)	PDE8B	rs182775622	Allelic Frequency	ALL	1	1 (0,045%)	p=0,028 OR - 0,01 (95% CI, 0,00-0,23)
			PRS	3	2018 (92,39%)					PRS	1	1 (3,125%)	
PDE3A	rs71539448	Genotype Frequency	ALL	11	8 (0,732%)	p=0,879	PDE8B	rs182775622	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,028 OR - 0,01 (95% CI, 0,00-0,23)
			PRS	33	934 (85,53%)					PRS	3	31 (96,87%)	
PDE3A	rs78782960	Allelic Frequency	ALL	1	165 (7,554%)	p=0,730 OR - 0,78 (95% CI, 0,23-2,62)	PDE8B	rs186753	Allelic Frequency	ALL	2	0 (0%)	p=
			PRS	3	2019 (92,44%)					PRS	4	2184 (100%)	
PDE3A	rs78782960	Genotype Frequency	ALL	11	9 (0,824%)	p=0,744	PDE8B	rs186753	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=
			PRS	33	936 (85,71%)					PRS	4	32 (100%)	
PDE3B	rs1247719	Allelic Frequency	ALL	2	24 (1,098%)	p=1 OR - 0,98 (95% CI, 0,98-0,99)	PDE8B	rs335614	Allelic Frequency	ALL	1	564 (25,82%)	p=1 OR - 1,04 (95% CI, 0,46-2,33)
			PRS	4	2160 (98,90%)					PRS	3	24 (75%)	
PDE3B	rs1247719	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=0,999 OR - 0,97 (95% CI, 0,96-0,98)	PDE8B	rs335614	Genotype Frequency	ALL	11	82 (7,509%)	p=0,204
			PRS	44	1068 (97,80%)					PRS	33	610 (55,86%)	
PDE3B	rs1247720	Allelic Frequency	ALL	2	24 (1,098%)	p=1 OR - 0,98 (95% CI, 0,98-0,99)	PDE8B	rs40594	Allelic Frequency	ALL	1	1346 (61,63%)	p=0,017 OR - 2,34 (95% CI, 1,15-4,77)
			PRS	4	2160 (98,90%)					PRS	3	838 (38,36%)	
PDE3B	rs1247720	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=0,999 OR - 0,97 (95% CI, 0,96-0,98)	PDE8B	rs40594	Genotype Frequency	ALL	11	445 (40,75%)	p=0,051
			PRS	44	1068 (97,80%)					PRS	33	191 (17,49%)	
PDE3B	rs4757268	Allelic Frequency	ALL	1	772 (35,34%)	p=0,577 OR - 0,79 (95% CI, 0,39-1,62)	PDE8B	rs62362531	Allelic Frequency	ALL	2	250 (11,44%)	p=0,999 OR - 1,24 (95% CI, 0,37-4,13)
			PRS	3	1412 (64,65%)					PRS	4	1934 (88,55%)	
PDE3B	rs4757268	Genotype Frequency	ALL	11	137 (12,54%)	p=0,777	PDE8B	rs62362531	Genotype Frequency	ALL	22	19 (1,739%)	p=0,752
			PRS	33	457 (41,84%)					PRS	44	861 (78,84%)	
PDE4A	rs1051738	Allelic Frequency	ALL	1	388 (17,76%)	p=0,346 OR - 2,08 (95% CI, 0,63-6,89)	PDE9A	rs1045382	Allelic Frequency	ALL	2	1181 (54,07%)	p=0,049 OR - 0,46 (95% CI, 0,21-1,00)
			PRS	4	1796 (82,23%)					PRS	4	1003 (45,92%)	
PDE4A	rs1051738	Genotype Frequency	ALL	11	36 (3,296%)	p=0,351	PDE9A	rs1045382	Genotype Frequency	ALL	22	343 (31,41%)	p=0,118
			PRS	44	740 (67,76%)					PRS	44	254 (23,26%)	
PDE4A	rs138164292	Allelic Frequency	ALL	2	0 (7%)	p=	PDE9A	rs13047953	Allelic Frequency	ALL	2	698 (31,95%)	p=1 OR - 1,03 (95% CI, 0,48-2,19)
			PRS	4	0 (7%)					PRS	4	1486 (68,04%)	
PDE4A	rs138164292	Genotype Frequency	ALL	22	??? (7%)	p=	PDE9A	rs13047953	Genotype Frequency	ALL	22	146 (13,36%)	p=0,560
			PRS	44	??? (7%)					PRS	44	540 (49,45%)	
PDE4A	rs141286487	Allelic Frequency	ALL	2	9 (0,412%)	p=0,135 OR - 0,12 (95% CI, 0,01-1,04)	PDE9A	rs2269153	Allelic Frequency	ALL	1	805 (36,85%)	p=0,854 OR - 1,11 (95% CI, 0,53-2,32)
			PRS	4	2175 (99,58%)					PRS	3	1379 (63,14%)	
PDE4A	rs141286487	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=0,135 OR - 0,12 (95% CI, 0,01-1,04)	PDE9A	rs2269153	Genotype Frequency	ALL	11	171 (15,65%)	p=0,938
			PRS	44	1083 (99,17%)					PRS	33	458 (41,94%)	
PDE4A	rs74453701	Allelic Frequency	ALL	3	2129 (97,48%)	p=0,198 OR - 2,58 (95% CI, 0,60-11,0)	PDE9A	rs3087994	Allelic Frequency	ALL	1	1194 (54,67%)	p=0,071 OR - 0,47 (95% CI, 0,21-1,02)
			PRS	4	55 (2,518%)					PRS	4	990 (45,32%)	

Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance
PDE4A	rs74453701	Genotype Frequency	ALL	33	1038 (95,05%)	p=0,487	PDE9A	rs3087994	Genotype Frequency	ALL	11	345 (31,59%)	p=0,135
			44	1 (0,091%)	44					243 (22,25%)			
			34	53(4,853%)	14					504 (46,15%)			
			PRS	33	14 (87,5%)					11	8 (50%)		
			44	0 (0%)				44	1 (6,25%)				
			34	2(12,5%)					14	7 (43,75%)			
PDE4B	rs114408173	Allelic Frequency	ALL	1	12(0,549%)	p=0,172 OR - 0,17 (95% CI, 0,02-1,35)	PDE9A	rs71320554	Allelic Frequency	ALL	2	39 (1,785%)	p=0,444 OR - 0,56 (95% CI, 0,07-4,23)
			3	2172 (99,45%)	4					2145 (98,21%)			
			PRS	1	1 (3,125%)					2	1 (3,125%)		
			3	31(96,87%)	4					31 (96,87%)			
PDE4B	rs114408173	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,173 OR - 0,16 (95% CI, 0,02-1,36)	PDE9A	rs71320554	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=0,446 OR - 0,55 (95% CI, 0,07-4,31)
			33	1080 (98,90%)	44					1053 (96,42%)			
			13	12(1,098%)	24					39 (3,571%)			
			PRS	11	0 (0%)					22	0 (0%)		
			33	15(93,75%)				44	15 (93,75%)				
			13	1(6,25%)				24	1 (6,25%)				
PDE4B	rs200851592	Allelic Frequency	ALL	3	0 (?)	p=	PDE10A	rs220740	Allelic Frequency	ALL	2	492 (22,52%)	p=0,285 OR - 0,63 (95% CI, 0,30-1,35)
			4	0 (?)	4					1692 (77,47%)			
			PRS	3	16 (50%)					2	10 (31,25%)		
			4	16 (50%)	4					22 (68,75%)			
PDE4B	rs200851592	Genotype Frequency	ALL	33	??? (?)	p=	PDE10A	rs220740	Genotype Frequency	ALL	22	59 (5,402%)	p=0,044
			44	??? (?)	44					659 (60,34%)			
			34	??? (?)	24					374 (34,24%)			
			PRS	33	1(6,25%)					22	0 (0%)		
			44	1(6,25%)				44	6 (37,5%)				
			34	14 (87,5%)				24	10 (62,5%)				
PDE4B	rs34492439	Allelic Frequency	ALL	2	0 (?)	p=	PDE10A	rs73022128	Allelic Frequency	ALL	2	1949 (89,23%)	p=0,999 OR - 0,85 (95% CI, 0,25-2,83)
			4	0 (?)	4					235 (10,76%)			
			PRS	2	0 (?)					2	29 (90,62%)		
			4	0 (?)	4					3 (9,375%)			
PDE4B	rs34492439	Genotype Frequency	ALL	22	??? (?)	p=	PDE10A	rs73022128	Genotype Frequency	ALL	22	869 (79,57%)	p=0,836
			44	??? (?)	44					12 (1,098%)			
			24	??? (?)	24					211 (19,32%)			
			PRS	22	??? (?)					22	13 (81,25%)		
			44	??? (?)				44	0 (0%)				
			24	??? (?)				24	3 (18,75%)				
PDE4B	rs7534999	Allelic Frequency	ALL	2	59(2,701%)	p=0,587 OR - 0,86 (95% CI, 0,11-6,41)	PDE10A	rs77122094	Allelic Frequency	ALL	1	12 (0,549%)	p=0,016 OR - 0,08 (95% CI, 0,01-0,38)
			2	1 (3,125%)	1					2172 (99,45%)			
			PRS	4	31(96,87%)					2	2 (6,25%)		
			2	3 (0,274%)	2					30 (93,75%)			
PDE4B	rs7534999	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=0,318	PDE10A	rs77122094	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,016 OR - 0,07 (95% CI, 0,01-0,38)
			44	1036 (94,87%)	12					1080 (98,90%)			
			24	53(4,853%)	12					12 (1,098%)			
			PRS	22	0 (0%)					11	0 (0%)		
			44	15(93,75%)				12	14 (87,5%)				
			24	1(6,25%)				12	2 (12,5%)				
PDE4B	rs75398902	Allelic Frequency	ALL	3	34(1,556%)	p=0,401 OR - 0,49 (95% CI, 0,06-3,69)	PDE10A	rs79469867	Allelic Frequency	ALL	2	2024 (92,67%)	p=0,292 OR - 1,80 (95% CI, 0,62-5,21)
			4	2150 (98,44%)	4					160 (7,326%)			
			PRS	3	1 (3,125%)					2	28 (87,5%)		
			4	31(96,87%)	4					4 (12,5%)			
PDE4B	rs75398902	Genotype Frequency	ALL	33	0 (0%)	p=0,403 OR - 0,48 (95% CI, 0,06-3,75)	PDE10A	rs79469867	Genotype Frequency	ALL	22	940 (86,08%)	p=0,410
			44	1058 (96,88%)	44					8 (0,732%)			
			34	34(3,113%)	24					144 (13,18%)			
			PRS	33	0 (0%)					22	12 (75%)		
			44	15(93,75%)				44	0 (0%)				
			34	1(6,25%)				24	4 (25%)				
PDE4B	rs783036	Allelic Frequency	ALL	1	1015 (46,47%)	p=0,723 OR - 0,86 (95% CI, 0,43-1,74)	PDE10A	rs9459421	Allelic Frequency	ALL	2	1902 (87,08%)	p=0,790 OR - 0,69 (95% CI, 0,21-2,30)
			3	1169 (53,52%)	4					282 (12,91%)			
			PRS	1	16 (50%)					2	29 (90,62%)		
			3	16 (50%)	4					3 (9,375%)			
PDE4B	rs783036	Genotype Frequency	ALL	11	286 (26,19%)	p=0,904	PDE10A	rs9459421	Genotype Frequency	ALL	22	841 (77,01%)	p=0,620
			33	363 (33,24%)	44					31 (2,838%)			
			13	443 (40,56%)	24					220 (20,14%)			
			PRS	11	5 (31,25%)					22	13 (81,25%)		
			33	5 (31,25%)				44	0 (0%)				
			13	6(37,5%)				24	3 (18,75%)				
PDE4B	rs783039	Allelic Frequency	ALL	1	328 (15,01%)	p=0,001 OR - 0,29 (95% CI, 0,14-0,60)	PDE11A	rs1047884	Allelic Frequency	ALL	3	1500 (68,68%)	p=0,565 OR - 0,73 (95% CI, 0,32-1,63)
			3	1856 (84,98%)	4					684 (31,31%)			
			PRS	1	12 (37,5%)					3	24 (75%)		
			3	20 (62,5%)	4					8 (25%)			
PDE4B	rs783039	Genotype Frequency	ALL	11	33(3,021%)	p=0,004	PDE11A	rs1047884	Genotype Frequency	ALL	33	533 (48,80%)	p=0,726
			33	797 (72,98%)	44					125 (11,44%)			
			13	262 (23,99%)	34					434 (39,74%)			
			PRS	11	4 (25%)					33	9 (56,25%)		
			33	8 (50%)				44	1 (6,25%)				
			13	4 (25%)				34	6 (37,5%)				
PDE4C	rs783039	Allelic Frequency	ALL	2	557 (25,50%)	p=0,024 OR - 0,44 (95% CI, 0,21-0,89)	PDE11A	rs115616942	Allelic Frequency	ALL	1	58 (2,655%)	p=0,580 OR - 0,84 (95% CI, 0,11-6,30)
			4	1627 (74,49%)	4					2126 (97,34%)			
			PRS	2	14(43,75%)					1	1 (3,125%)		
			4	18(56,25%)	4					31 (96,87%)			
PDE4C	rs783039	Genotype Frequency	ALL	22	88(8,058%)	p=0,091	PDE11A	rs115616942	Genotype Frequency	ALL	11	1 (0,091%)	p=0,967
			44	623 (57,05%)	14					1035 (94,78%)			
			24	381 (34,89%)	14					56 (5,128%)			
			PRS	22	4 (25%)					11	0 (0%)		
			44	6(37,5%)				44	15 (93,75%)				
			24	6(37,5%)				14	1 (6,25%)				

Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance
PDE4D	rs11950492	Allelic Frequency	ALL	1	1815 (83,10%)	p=0,999 OR - 0,91 (95% CI, 0,34-2,38)	PDE11A	rs115662866	Allelic Frequency	ALL	1	39 (1,785%)	p=0,444 OR - 0,56 (95% CI, 0,07-4,23)
			3	369 (16,89%)	3					2145 (98,21%)			
			PRS	1	27 (84,37%)					1	1 (3,125%)		
			3	5 (15,62%)					3	31 (96,87%)			
PDE4D	rs11950492	Genotype Frequency	ALL	11	758 (69,41%)	p=0,576	PDE11A	rs115662866	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,446 OR - 0,55 (95% CI, 0,07-4,31)
			33	35 (3,205%)	33					1053 (96,42%)			
			13	299 (27,38%)	13					39 (3,571%)			
			11	11 (68,75%)					11	0 (0%)			
			33	0 (0%)					33	15 (93,75%)			
			13	5 (31,25%)					13	1 (6,25%)			
PDE4D	rs11950495	Allelic Frequency	ALL	1	1992 (91,20%)	p=0,756 OR - 1,07 (95% CI, 0,32-3,55)	PDE11A	rs13012088	Allelic Frequency	ALL	1	158 (7,234%)	p=0,724 OR - 2,41 (95% CI, 0,32-17,8)
			3	192 (8,791%)	3					2026 (92,76%)			
			PRS	1	29 (90,62%)					PRS	1	1 (3,125%)	
			3	3 (9,375%)					3	31 (96,87%)			
PDE4D	rs11950495	Genotype Frequency	ALL	11	914 (83,69%)	p=0,758	PDE11A	rs13012088	Genotype Frequency	ALL	11	11 (1,007%)	p=0,603
			33	14 (1,282%)	33					945 (86,53%)			
			13	164 (15,01%)	13					136 (12,45%)			
			11	13 (81,25%)					11	0 (0%)			
			33	0 (0%)					33	15 (93,75%)			
			13	3 (18,75%)					13	1 (6,25%)			
PDE4D	rs11959349	Allelic Frequency	ALL	1	1815 (83,10%)	p=0,638 OR - 0,70 (95% CI, 0,24-2,01)	PDE11A	rs1435573	Allelic Frequency	ALL	2	246 (11,26%)	p=0,250 OR - 3,93 (95% CI, 0,53-28,9)
			4	369 (16,89%)	3					1938 (88,73%)			
			PRS	1	28 (87,5%)					PRS	2	1 (3,125%)	
			4	4 (12,5%)					3	31 (96,87%)			
PDE4D	rs11959349	Genotype Frequency	ALL	11	758 (69,41%)	p=0,570	PDE11A	rs1435573	Genotype Frequency	ALL	22	23 (2,106%)	p=0,254
			44	35 (3,205%)	33					869 (79,57%)			
			14	299 (27,38%)	23					200 (18,31%)			
			11	12 (75%)					22	0 (0%)			
			44	0 (0%)					33	15 (93,75%)			
			14	4 (25%)					23	1 (6,25%)			
PDE4D	rs1553114	Allelic Frequency	ALL	2	1764 (80,76%)	p=1 OR - 0,96 (95% CI, 0,39-2,36)	PDE11A	rs2293473	Allelic Frequency	ALL	1	190 (8,699%)	p=0,520 OR - 0,66 (95% CI, 0,23-1,92)
			4	420 (19,23%)	3					1994 (91,30%)			
			PRS	2	26 (81,25%)					PRS	1	4 (12,5%)	
			4	6 (18,75%)					3	28 (87,5%)			
PDE4D	rs1553114	Genotype Frequency	ALL	22	720 (65,93%)	p=0,882	PDE11A	rs2293473	Genotype Frequency	ALL	11	17 (1,556%)	p=0,430
			44	48 (4,395%)	33					919 (84,15%)			
			24	324 (29,67%)	13					156 (14,28%)			
			22	11 (68,75%)					11	0 (0%)			
			44	1 (6,25%)					33	12 (75%)			
			24	4 (25%)					13	4 (25%)			
PDE4D	rs72769729	Allelic Frequency	ALL	2	211 (9,661%)	p=0,358 OR - 3,31 (95% CI, 0,45-24,4)	PDE11A	rs3821010	Allelic Frequency	ALL	1	1284 (58,79%)	p=0,150 OR - 0,55 (95% CI, 0,25-1,21)
			4	1973 (90,33%)	3					900 (41,20%)			
			PRS	2	1 (3,125%)					PRS	1	23 (71,87%)	
			4	31 (96,87%)					3	9 (28,12%)			
PDE4D	rs72769729	Genotype Frequency	ALL	22	9 (0,824%)	p=0,350	PDE11A	rs3821010	Genotype Frequency	ALL	11	409 (37,45%)	p=0,028
			44	890 (81,50%)	33					217 (19,87%)			
			24	193 (17,67%)	13					466 (42,67%)			
			22	0 (0%)					11	7 (43,75%)			
			44	15 (93,75%)					33	0 (0%)			
			24	1 (6,25%)					13	9 (56,25%)			
PDE5A	rs11947234	Allelic Frequency	ALL	1	1537 (70,37%)	p=0,361 OR - 0,79 (95% CI, 0,49-1,26)	PDE11A	rs6433711	Allelic Frequency	ALL	2	2164 (99,08%)	p=0,999 OR - 0,99 (95% CI, 0,98-0,99)
			3	647 (29,62%)	4					20 (0,915%)			
			PRS	1	72 (75%)					PRS	2	32 (100%)	
			3	24 (25%)					4	0 (0%)			
PDE5A	rs11947234	Genotype Frequency	ALL	11	543 (49,72%)	p=0,145	PDE11A	rs6433711	Genotype Frequency	ALL	22	1073 (98,26%)	p=0,756
			33	98 (8,974%)	44					1 (0,091%)			
			13	451 (41,30%)	24					18 (1,648%)			
			11	25 (52,08%)					22	16 (100%)			
			33	1 (2,083%)					44	0 (0%)			
			13	22 (45,83%)					24	0 (0%)			
PDE5A	rs142272118	Allelic Frequency	ALL	2	12 (0,549%)	p=0,172 OR - 0,17 (95% CI, 0,02-1,35)	PDE11A	rs6720891	Allelic Frequency	ALL	2	1284 (58,79%)	p=0,071 OR - 0,47 (95% CI, 0,21-1,06)
			4	2172 (99,45%)	4					900 (41,20%)			
			PRS	2	1 (3,125%)					PRS	2	24 (75%)	
			4	31 (96,87%)					4	8 (25%)			
PDE5A	rs142272118	Genotype Frequency	ALL	22	1 (0,091%)	p=0,343	PDE11A	rs6720891	Genotype Frequency	ALL	22	409 (37,45%)	p=0,181
			44	1081 (98,99%)	44					217 (19,87%)			
			24	10 (0,915%)	24					466 (42,67%)			
			22	0 (0%)					22	9 (56,25%)			
			44	15 (93,75%)					44	1 (6,25%)			
			24	1 (6,25%)					24	6 (37,5%)			
PDE5A	rs144204269	Allelic Frequency	ALL	2	2181 (99,86%)	p=0,158 OR - 7,65 (95% CI, 0,78-74,2)	PDE11A	rs71423514	Allelic Frequency	ALL	2	2025 (92,71%)	p=0,725 OR - 0,41 (95% CI, 0,05-3,02)
			3	3 (0,137%)	4					159 (7,280%)			
			PRS	2	95 (98,95%)					PRS	2	31 (96,87%)	
			3	1 (0,041%)					4	1 (3,125%)			
PDE5A	rs144204269	Genotype Frequency	ALL	22	1089 (99,72%)	p=0,158 OR - 7,72 (95% CI, 0,78-75,6)	PDE11A	rs71423514	Genotype Frequency	ALL	22	944 (86,44%)	p=0,597
			33	0 (0%)	44					11 (1,007%)			
			23	3 (0,274%)	24					137 (12,54%)			
			22	47 (97,91%)					22	15 (93,75%)			
			33	0 (0%)					44	0 (0%)			
			23	1 (2,083%)					24	1 (6,25%)			
PDE5A	rs148360694	Allelic Frequency	ALL	2	1 (0,045%)	p=0,028 OR - 0,01 (95% CI, 0,00-0,23)	PDE11A	rs71423544	Allelic Frequency	ALL	1	134 (6,135%)	p=0,718 OR - 2,02 (95% CI, 0,27-14,9)
			4	2183 (99,95%)	4					2050 (93,86%)			
			PRS	2	1 (3,125%)					PRS	1	1 (3,125%)	
			4	31 (96,87%)					4	31 (96,87%)			

Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance
PDE5A	rs146380504	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=0,028 OR - 0,00-0,23	PDE11A	rs75422054	Genotype Frequency	ALL	11	6 (0,549%)	p=0,777
			44	1091 (99,90%)	44					964 (88,27%)			
			24	1 (0,091%)	14					122 (11,17%)			
PDE5A	rs17051276	Allelic Frequency	ALL	1	2122 (97,16%)	p=0,357 OR - 1,48 (95% CI, 0,52-4,17)	PDE11A	rs75461311	Allelic Frequency	ALL	1	2105 (96,38%)	p=0,029 OR - 3,80 (95% CI, 1,30-11,1)
			4	62 (2,838%)	3					79 (3,617%)			
			PRs	1	92 (95,83%)					PRs	1	28 (87,5%)	
PDE5A	rs17051276	Genotype Frequency	ALL	11	1031 (94,41%)	p=0,704	PDE11A	rs75461311	Genotype Frequency	ALL	11	1015 (92,94%)	p=0,079
			44	1 (0,091%)	33					2 (0,183%)			
			14	60 (5,494%)	13					75 (6,868%)			
PDE5A	rs3733526	Allelic Frequency	ALL	1	1769 (80,99%)	p=0,080 OR - 0,55 (95% CI, 0,29-1,04)	PDE11A	rs75672043	Allelic Frequency	ALL	1	156 (7,142%)	p=1 OR - 1,15 (95% CI, 0,27-4,87)
			3	415 (19,00%)	3					2028 (92,85%)			
			PRs	1	85 (88,54%)					PRs	1	2 (6,25%)	
PDE5A	rs3733526	Genotype Frequency	ALL	11	723 (66,20%)	p=0,148	PDE11A	rs75672043	Genotype Frequency	ALL	11	9 (0,824%)	p=0,876
			44	46 (4,212%)	33					945 (86,53%)			
			13	323 (29,57%)	13					138 (12,63%)			
PDE5A	rs1045177	Allelic Frequency	ALL	1	31 (1,419%)	p=0,080 OR - 0,21 (95% CI, 0,04-0,94)	PDE11A	rs77597060	Allelic Frequency	ALL	2	2182 (99,90%)	p=0,042 OR - 35,1 (95% CI, 3,10-398,)
			3	2153 (98,58%)	4					2 (0,091%)			
			PRs	1	2 (6,25%)					PRs	2	31 (96,87%)	
PDE5A	rs1046277	Genotype Frequency	ALL	11	1 (0,091%)	p=0,208	PDE11A	rs79707060	Genotype Frequency	ALL	22	1090 (99,81%)	p=0,042 OR - 3,12-42,2)
			33	1062 (97,25%)	44					0 (0%)			
			13	29 (2,655%)	24					2 (0,183%)			
PDE5A	rs114886951	Allelic Frequency	ALL	1	2183 (99,95%)	p=0,005 OR - 46,4 (95% CI, 4,17-516,)	PDE11A	rs79903863	Allelic Frequency	ALL	1	1 (0,045%)	p=0,000 OR - 0,00 (95% CI, 0,00-0,04)
			3	1 (0,045%)	4					2183 (99,95%)			
			PRs	1	94 (97,91%)					PRs	1	3 (9,375%)	
PDE5A	rs11488951	Genotype Frequency	ALL	11	1091 (99,90%)	p=0,005 OR - 4,2-53,2)	PDE11A	rs79903863	Genotype Frequency	ALL	11	0 (0%)	p=0,000 OR - 0,00 (95% CI, 0,00-0,04)
			33	0 (0%)	44					1091 (99,90%)			
			13	1 (0,091%)	14					1 (0,091%)			
PDE5A	rs3733523	Allelic Frequency	ALL	2	651 (29,80%)	p=0,493 OR - 1,20 (95% CI, 0,75-1,91)	PDE11A	rs10201180	Allelic Frequency	ALL	2	449 (20,55%)	p=0,026 OR - 0,43 (95% CI, 0,20-0,88)
			4	1533 (70,19%)	4					1735 (79,44%)			
			PRs	2	25 (26,04%)					PRs	2	12 (37,5%)	
PDE5A	rs3733523	Genotype Frequency	ALL	22	98 (8,974%)	p=0,135	PDE11A	rs10201180	Genotype Frequency	ALL	22	42 (3,846%)	p=0,086
			44	539 (49,35%)	44					685 (62,72%)			
			24	455 (41,66%)	24					365 (33,42%)			
PDE5A	rs3733524	Allelic Frequency	ALL	2	1602 (73,35%)	p=0,637 OR - 0,86 (95% CI, 0,53-1,39)	PDE11A	rs17400325	Allelic Frequency	ALL	2	2116 (96,88%)	p=0,268 OR - 2,07 (95% CI, 0,48-8,85)
			4	582 (26,64%)	4					68 (3,113%)			
			PRs	2	73 (76,04%)					PRs	2	30 (93,75%)	
PDE5A	rs3733524	Genotype Frequency	ALL	22	598 (54,76%)	p=0,178	PDE11A	rs17400325	Genotype Frequency	ALL	22	1025 (93,86%)	p=0,630
			44	88 (8,058%)	44					1 (0,091%)			
			24	406 (37,17%)	24					66 (6,043%)			
PDE6A	rs113309832	Allelic Frequency	ALL	2	23 (1,053%)	p=0,295 OR - 0,32 (95% CI, 0,04-2,52)	PDE11A	rs75127279	Allelic Frequency	ALL	2	24 (1,098%)	p=0,029 OR - 0,26 (95% CI, 0,08-0,76)
			4	2161 (98,94%)	4					2160 (98,90%)			
			PRs	2	1 (3,125%)					PRs	2	4 (4,081%)	
PDE6A	rs113309832	Genotype Frequency	ALL	22	2 (0,183%)	p=0,555	PDE11A	rs75127279	Genotype Frequency	ALL	22	0 (0%)	p=0,030
			44	1071 (98,07%)	44					1068 (97,80%)			
			24	19 (1,739%)	24					24 (2,197%)			
			PRs	22	0 (0%)				PRs	22	1 (2,040%)		
			44	15 (93,75%)					44	46 (93,87%)			
			24	1 (6,25%)					24	2 (4,081%)			

## 8.2 APÊNDICE 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE PACIENTES E EUROPEUS

Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance
PDE1A	rs3754929	Allelic Frequency	EUR	1	482 (63,58%)	p=0,446 OR - 1,32 (95% CI, 0,64-2,72)	PDE6A	rs2277925	Allelic Frequency	EUR	2	632 (83,37%)	p=0,806 OR - 0,71 (95% CI, 0,24-2,07)
			3	276 (36,41%)	3					126 (16,62%)			
			PRS	1	20 (62,5%)					PRS	2	28 (87,5%)	
			3	12 (37,5%)					3	4 (12,5%)			
PDE1A	rs3754929	Genotype Frequency	EUR	11	157 (41,42%)	p=0,314	PDE6A	rs2277925	Genotype Frequency	EUR	22	266 (70,18%)	p=0,378
			33	54 (14,24%)	33					13 (3,430%)			
			13	168 (44,32%)	23					100 (26,38%)			
			PRS	11	5 (31,25%)					22	13 (81,25%)		
			33	1 (6,25%)	33					1 (6,25%)			
			13	10 (62,5%)	23					2 (12,5%)			
PDE1A	rs67483153	Allelic Frequency	EUR	1	42 (5,540%)	p=0,697 OR - 0,87 (95% CI, 0,20-3,80)	PDE6A	rs2277926	Allelic Frequency	EUR	1	126 (16,62%)	p=0,338 OR - 1,92 (95% CI, 0,57-6,42)
			3	716 (94,45%)	3					632 (83,37%)			
			PRS	1	2 (6,25%)					PRS	1	3 (9,375%)	
			3	30 (93,75%)					3	29 (90,62%)			
PDE1A	rs67483153	Genotype Frequency	EUR	11	1 (0,263%)	p=0,932	PDE6A	rs2277926	Genotype Frequency	EUR	11	13 (3,430%)	p=0,113
			33	338 (89,18%)	33					266 (70,18%)			
			13	40 (10,55%)	13					100 (26,38%)			
			PRS	11	0 (0%)					11	1 (6,25%)		
			33	14 (87,5%)	33					14 (87,5%)			
			13	2 (12,5%)	13					1 (6,25%)			
PDE1B	rs1249950	Allelic Frequency	EUR	2	402 (53,03%)	p=0,856 OR - 0,87 (95% CI, 0,20-3,80)	PDE6A	rs75282782	Allelic Frequency	EUR	3	751 (99,07%)	p=0,282 OR - 3,54 (95% CI, 0,41-29,0)
			4	356 (46,96%)	4					7 (0,923%)			
			PRS	2	16 (50%)					PRS	3	31 (96,87%)	
			4	16 (50%)					4	1 (3,125%)			
PDE1B	rs1249950	Genotype Frequency	EUR	22	113 (29,81%)	p=0,015	PDE6A	rs75282782	Genotype Frequency	EUR	33	372 (98,15%)	p=0,283 OR - 3,54 (95% CI, 0,40-30,6)
			44	90 (23,74%)	44					0 (0%)			
			24	176 (46,43%)	34					7 (1,846%)			
			PRS	22	7 (43,75%)					33	15 (93,75%)		
			44	7 (43,75%)	44					0 (0%)			
			24	2 (12,5%)	34					1 (6,25%)			
PDE1C	rs113385926	Allelic Frequency	EUR	2	723 (95,38%)	p=1 OR - 0,66 (95% CI, 0,08- 5,02)	PDE6A	rs76082232	Allelic Frequency	EUR	4	731 (96,43%)	p=0,330 OR - 1,80 (95% CI, 0,41-7,94)
			4	35 (4,617%)	4					27 (3,562%)			
			PRS	2	31 (96,87%)					PRS	2	30 (93,75%)	
			4	1 (3,125%)					4	2 (6,25%)			
PDE1C	rs113385926	Genotype Frequency	EUR	22	346 (91,29%)	p=0,881	PDE6A	rs76082232	Genotype Frequency	EUR	22	352 (92,87%)	p=0,331 OR - 1,86 (95% CI, 0,40-8,62)
			44	2 (0,527%)	44					0 (0%)			
			24	31 (81,79%)	24					27 (7,124%)			
			PRS	22	15 (93,75%)					22	14 (87,5%)		
			44	0 (0%)	44					0 (0%)			
			24	1 (6,25%)	24					2 (12,5%)			
PDE1C	rs115957738	Allelic Frequency	EUR	1	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	PDE6B	rs115775983	Allelic Frequency	EUR	1	11 (1,451%)	p=0,093 OR - 0,22 (95% CI, 0,04-1,04)
			3	758 (100%)	3					747 (98,54%)			
			PRS	1	1 (3,125%)					PRS	1	2 (6,25%)	
			3	31 (96,87%)					3	30 (93,75%)			
PDE1C	rs115957738	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)	PDE6B	rs115775983	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,092 OR - 0,20 (95% CI, 0,04-1,03)
			33	379 (100%)	33					368 (97,09%)			
			13	0 (0%)	13					11 (2,902%)			
			PRS	11	0 (0%)					11	0 (0%)		
			33	15 (93,75%)	33					14 (87,5%)			
			13	1 (6,25%)	13					2 (12,5%)			
PDE1C	rs116449276	Allelic Frequency	EUR	2	0 (0%)	p=0,001 OR - 1,06 (95% CI, 0,97-1,16)	PDE6B	rs147482093	Allelic Frequency	EUR	1	4 (0,527%)	p=0,187 OR - 0,16 (95% CI, 0,01-1,51)
			4	758 (100%)	3					754 (99,47%)			
			PRS	2	2 (6,25%)					PRS	1	1 (3,125%)	
			4	30 (93,75%)					3	31 (96,87%)			
PDE1C	rs116449276	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,001 OR - 1,14 (95% CI, 0,94-1,37)	PDE6B	rs147482093	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,187 OR - 0,16 (95% CI, 0,01-1,51)
			44	379 (100%)	33					375 (98,94%)			
			24	0 (0%)	13					4 (1,055%)			
			PRS	22	0 (0%)					11	0 (0%)		
			44	14 (87,5%)	33					15 (93,75%)			
			24	2 (12,5%)	13					1 (6,25%)			
PDE1C	rs117088924	Allelic Frequency	EUR	1	741 (97,75%)	p=0,528 OR - 1,40 (95% CI, 0,18-10,9)	PDE6B	rs61734864	Allelic Frequency	EUR	1	758 (100%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)
			2	17 (2,242%)	3					0 (0%)			
			PRS	1	31 (96,87%)					PRS	1	31 (96,87%)	
			2	1 (3,125%)					3	1 (3,125%)			
PDE1C	rs117088924	Genotype Frequency	EUR	11	362 (95,51%)	p=0,532 OR - 1,41 (95% CI, 0,17-11,3)	PDE6B	rs61734864	Genotype Frequency	EUR	11	379 (100%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)
			22	0 (0%)	33					0 (0%)			
			12	17 (4,485%)	13					0 (0%)			
			PRS	11	15 (93,75%)					11	15 (93,75%)		
			22	0 (0%)	33					0 (0%)			
			12	1 (6,25%)	13					1 (6,25%)			
PDE1C	rs1860790	Allelic Frequency	EUR	1	739 (97,49%)	p=0,567 OR - 1,25 (95% CI, 0,16-9,67)	PDE6B	rs61760239	Allelic Frequency	EUR	1	21 (2,770%)	p=0,068 OR - 0,27 (95% CI, 0,07-0,97)
			3	19 (2,506%)	4					737 (97,22%)			
			PRS	1	31 (96,87%)					PRS	1	3 (9,375%)	
			3	1 (3,125%)					4	29 (90,62%)			
PDE1C	rs1860790	Genotype Frequency	EUR	11	361 (95,25%)	p=0,913	PDE6B	rs61760239	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,065 OR - 0,25 (95% CI, 0,06-0,96)
			33	1 (0,263%)	44					358 (94,45%)			
			13	17 (4,485%)	14					21 (5,540%)			
			PRS	11	15 (93,75%)					11	0 (0%)		
			33	0 (0%)	44					13 (81,25%)			
			13	1 (6,25%)	14					3 (18,75%)			

Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	Alle/Gen	N	Significance
PDE1C	rs2302450	Allelic Frequency	EUR	1	194 (25,59%)	p=0,835 OR - 1,22 (95% CI, 0,52-2,88)	PDE6B	rs73058408	Allelic Frequency	EUR	1	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)
			3	564 (74,40%)	3					758 (100%)			
			PRS	1	7 (21,87%)					PRS	1	1 (3,125%)	
			3	25 (78,12%)					3	31 (96,87%)			
PDE1C	rs2302450	Genotype Frequency	EUR	11	28 (7,387%)	p=0,282	PDE6B	rs73058408	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)
			33	213 (56,20%)	33					379 (100%)			
			13	138 (36,41%)	13					0 (0%)			
			11	0 (0%)					11	0 (0%)			
			PRS	33	9 (56,25%)				PRS	33	15 (93,75%)		
			13	7 (43,75%)					13	1 (6,25%)			
PDE1C	rs3213709	Allelic Frequency	EUR	1	594 (78,36%)	p=0,828 OR - 0,83 (95% CI, 0,33-2,06)	PDE6C	rs11187564	Allelic Frequency	EUR	2	55 (7,255%)	p=0,720 OR - 2,42 (95% CI, 0,32-18,1)
			3	164 (21,63%)	4					703 (92,74%)			
			PRS	1	26 (81,25%)					PRS	2	1 (3,125%)	
			3	6 (18,75%)					4	31 (96,87%)			
PDE1C	rs3213709	Genotype Frequency	EUR	11	235 (62,00%)	p=0,415	PDE6C	rs11187564	Genotype Frequency	EUR	22	4 (1,055%)	p=0,607
			33	20 (5,277%)	44					328 (86,54%)			
			13	124 (32,71%)	24					47 (12,40%)			
			11	10 (62,5%)					22	0 (0%)			
			PRS	33	0 (0%)				PRS	44	15 (93,75%)		
			13	6 (37,5%)					24	1 (6,25%)			
PDE1C	rs61729940	Allelic Frequency	EUR	1	91 (12,00%)	p=0,571 OR - 2,04 (95% CI, 0,48-8,70)	PDE6C	rs1409332	Allelic Frequency	EUR	1	399 (52,63%)	p=0,589 OR - 1,25 (95% CI, 0,62-2,55)
			3	667 (87,99%)	4					359 (47,36%)			
			PRS	1	2 (6,25%)					PRS	1	15 (46,87%)	
			3	30 (93,75%)					4	17 (53,12%)			
PDE1C	rs61729940	Genotype Frequency	EUR	11	9 (2,374%)	p=0,516	PDE6C	rs1409332	Genotype Frequency	EUR	11	114 (30,07%)	p=0,825
			33	297 (78,36%)	44					94 (24,80%)			
			13	73 (19,26%)	14					171 (45,11%)			
			11	0 (0%)					11	4 (25%)			
			PRS	33	14 (87,5%)				PRS	44	5 (31,25%)		
			13	2 (12,5%)					14	7 (43,75%)			
PDE1C	rs61736729	Allelic Frequency	EUR	3	4 (0,527%)	p=0,187 OR - 0,16 (95% CI, 0,01-1,51)	PDE6C	rs182445749	Allelic Frequency	EUR	1	756 (99,73%)	p=0,116 OR - 12,1 (95% CI, 1,07-138,)
			4	754 (99,47%)	3					2 (0,263%)			
			PRS	3	1 (3,125%)					PRS	1	31 (96,87%)	
			4	31 (96,87%)					3	1 (3,125%)			
PDE1C	rs61736729	Genotype Frequency	EUR	33	0 (0%)	p=0,187 OR - 0,16 (95% CI, 0,01-1,51)	PDE6C	rs182445749	Genotype Frequency	EUR	11	377 (99,47%)	p=0,116 OR - 12,5 (95% CI, 1,07-146,)
			44	4 (1,055%)	13					2 (0,527%)			
			33	0 (0%)	11					15 (93,75%)			
			44	15 (93,75%)					33	0 (0%)			
			34	1 (6,25%)					13	1 (6,25%)			
PDE1C	rs61745829	Allelic Frequency	EUR	2	750 (98,94%)	p=0,312 OR - 3,02 (95% CI, 0,36-24,9)	PDE6C	rs193276411	Allelic Frequency	EUR	1	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)
			4	8 (1,055%)	3					758 (100%)			
			PRS	2	31 (96,87%)					PRS	1	1 (3,125%)	
			4	1 (3,125%)					3	31 (96,87%)			
PDE1C	rs61745829	Genotype Frequency	EUR	22	371 (97,88%)	p=0,313 OR - 3,09 (95% CI, 0,36-26,3)	PDE6C	rs193276411	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)
			44	0 (0%)	33					379 (100%)			
			24	8 (2,110%)	13					0 (0%)			
			22	15 (93,75%)					11	0 (0%)			
			44	0 (0%)					33	15 (93,75%)			
			24	1 (6,25%)					13	1 (6,25%)			
PDE1C	rs73690312	Allelic Frequency	EUR	1	752 (99,20%)	p=0,252 OR - 4,04 (95% CI, 0,47-34,6)	PDE6C	rs3737228	Allelic Frequency	EUR	3	222 (29,28%)	p=0,171 OR - 0,60 (95% CI, 0,29-1,24)
			3	6 (0,791%)	4					536 (70,71%)			
			PRS	1	31 (96,87%)					PRS	3	13 (40,62%)	
			3	1 (3,125%)					4	19 (59,37%)			
PDE1C	rs73690312	Genotype Frequency	EUR	11	373 (98,41%)	p=0,253 OR - 4,14 (95% CI, 0,46-36,6)	PDE6C	rs3737228	Genotype Frequency	EUR	33	38 (10,02%)	p=0,435
			33	0 (0%)	44					195 (51,45%)			
			13	6 (1,583%)	34					146 (38,52%)			
			11	15 (93,75%)					33	3 (18,75%)			
			PRS	33	0 (0%)				PRS	44	6 (37,5%)		
			13	1 (6,25%)					34	7 (43,75%)			
PDE1C	rs76290787	Allelic Frequency	EUR	1	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	PDE6C	rs45522236	Allelic Frequency	EUR	2	6 (0,791%)	p=0,252 OR - 0,24 (95% CI, 0,02-2,11)
			3	758 (100%)	3					752 (99,20%)			
			PRS	1	1 (3,125%)					PRS	2	1 (3,125%)	
			3	31 (96,87%)					3	31 (96,87%)			
PDE1C	rs76290787	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)	PDE6C	rs45522236	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,253 OR - 0,24 (95% CI, 0,02-2,13)
			33	379 (100%)	33					373 (98,41%)			
			13	0 (0%)	23					6 (1,583%)			
			11	0 (0%)					22	0 (0%)			
			PRS	33	15 (93,75%)				PRS	33	15 (93,75%)		
			13	1 (6,25%)					23	1 (6,25%)			
PDE1C	rs78021925	Allelic Frequency	EUR	1	758 (100%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	PDE6C	rs616522	Allelic Frequency	EUR	1	199 (26,25%)	p=0,541 OR - 0,78 (95% CI, 0,36-1,68)
			2	0 (0%)	3					559 (73,74%)			
			PRS	1	31 (96,87%)					PRS	1	10 (31,25%)	
			2	1 (3,125%)					3	22 (68,75%)			
PDE1C	rs78021925	Genotype Frequency	EUR	11	379 (100%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)	PDE6C	rs616522	Genotype Frequency	EUR	11	32 (8,443%)	p=0,515
			22	0 (0%)	33					212 (55,93%)			
			12	0 (0%)	13					135 (35,62%)			
			11	15 (93,75%)					11	1 (6,25%)			
			PRS	22	0 (0%)				PRS	33	7 (43,75%)		
			12	1 (6,25%)					13	8 (50%)			

Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance
PDE2A	rs1135029	Allelic Frequency	EUR	2	366 (48,28%)	p=0,718 OR - 0,82 (95% CI, 0,40-1,67)	PDE6C	rs701865	Allelic Frequency	EUR	1	270 (35,62%)	p=0,131 OR - 0,55 (95% CI, 0,27-1,12)
			4	392 (51,71%)	EUR					2	488 (64,37%)		
			PRS	2	17 (5,3,12%)					PRS	1	16 (50%)	
			4	15 (46,87%)						2	16 (50%)		
PDE2A	rs1135029	Genotype Frequency	EUR	22	90 (23,74%)	p=0,734	PDE6C	rs701865	Genotype Frequency	EUR	11	59 (15,56%)	p=0,268
			44	103 (27,17%)	EUR					22	168 (44,32%)		
			24	186 (49,07%)	EUR					12	152 (40,10%)		
			22	4 (25%)					11	4 (25%)			
			44	3 (18,75%)					22	4 (25%)			
			24	9 (56,25%)					12	8 (50%)			
PDE2A	rs11824084	Allelic Frequency	EUR	3	0(0%)	p=0,001 OR - 1,06 (95% CI, 0,97-1,16)	PDE6C	rs714550	Allelic Frequency	EUR	1	259 (34,16%)	p=0,452 OR - 0,75 (95% CI, 0,36-1,56)
			4	758(100%)	EUR					3	499 (65,83%)		
			PRS	3	2 (6,25%)					PRS	1	13 (40,62%)	
			4	30 (93,75%)					3	19 (59,37%)			
PDE2A	rs11824084	Genotype Frequency	EUR	33	0(0%)	p=0,001 OR - 1,14 (95% CI, 0,94-1,37)	PDE6C	rs714550	Genotype Frequency	EUR	11	54 (14,24%)	p=0,071
			44	379(100%)	EUR					33	174 (45,91%)		
			34	0(0%)	EUR					13	151 (39,84%)		
			33	0(0%)					11	1 (6,25%)			
			44	14 (87,5%)					33	4 (25%)			
			34	2 (12,5%)					13	11 (68,75%)			
PDE2A	rs1980091	Allelic Frequency	EUR	1	239 (31,53%)	p=0,560 OR - 1,38 (95% CI, 0,61-3,12)	PDE6C	rs76999928	Allelic Frequency	EUR	2	758 (100%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)
			3	519 (68,46%)	EUR					3	0 (0%)		
			PRS	1	8 (25%)					PRS	2	31 (96,87%)	
			3	24(75%)					3	1 (3,125%)			
PDE2A	rs1980091	Genotype Frequency	EUR	11	39 (10,29%)	p=0,730	PDE6C	rs76999928	Genotype Frequency	EUR	22	379 (100%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)
			33	179 (47,22%)	EUR					33	0 (0%)		
			13	161 (42,48%)	EUR					23	0 (0%)		
			11	1 (6,25%)					22	15 (93,75%)			
			33	9 (56,25%)					33	0 (0%)			
			13	6 (37,5%)					23	1 (6,25%)			
PDE2A	rs392818	Allelic Frequency	EUR	1	0(0%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	PDE7A	rs11557049	Allelic Frequency	EUR	2	53 (6,992%)	p=0,489 OR - 0,72 (95% CI, 0,21-2,46)
			3	758(100%)	EUR					4	705 (93,00%)		
			PRS	1	1 (3,125%)					PRS	2	3 (9,375%)	
			3	31 (96,87%)					4	29 (90,62%)			
PDE2A	rs392818	Genotype Frequency	EUR	11	0(0%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)	PDE7A	rs11557049	Genotype Frequency	EUR	22	4 (1,055%)	p=0,635
			33	379(100%)	EUR					44	330 (87,07%)		
			13	0(0%)	EUR					24	45 (11,87%)		
			11	0(0%)					22	0 (0%)			
			33	15 (93,75%)					44	13 (81,25%)			
			13	1 (6,25%)					24	3 (18,75%)			
PDE2A	rs4944557	Allelic Frequency	EUR	1	0(0%)	p=0,001 OR - 1,06 (95% CI, 0,97-1,16)	PDE8A	rs11073917	Allelic Frequency	EUR	2	89 (11,74%)	p=0,783 OR - 0,93 (95% CI, 0,31-2,71)
			3	758(100%)	EUR					3	669 (88,25%)		
			PRS	1	2 (6,25%)					PRS	2	4 (12,5%)	
			3	30 (93,75%)					3	28 (87,5%)			
PDE2A	rs4944557	Genotype Frequency	EUR	11	0(0%)	p=0,001 OR - 1,14 (95% CI, 0,94-1,37)	PDE8A	rs11073917	Genotype Frequency	EUR	22	10 (2,638%)	p=0,546
			33	379(100%)	EUR					33	300 (79,15%)		
			13	0(0%)	EUR					23	69 (18,20%)		
			11	0(0%)					22	0 (0%)			
			33	14 (87,5%)					33	12 (75%)			
			13	2 (12,5%)					23	4 (25%)			
PDE2A	rs577536	Allelic Frequency	EUR	2	0(0%)	p=0,000 OR - 1,10 (95% CI, 0,98-1,23)	PDE8A	rs148254104	Allelic Frequency	EUR	2	2 (0,023%)	p=0,011 OR - 0,00 (95% CI, 0,00-0,08)
			4	758(100%)	EUR					4	8596 (99,97%)		
			PRS	2	3 (9,375%)					PRS	2	1 (3,125%)	
			4	29 (90,62%)					4	31 (96,87%)			
PDE2A	rs577536	Genotype Frequency	EUR	22	0(0%)	p=0,001	PDE8A	rs148254104	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,011 OR - 0,00 (95% CI, 0,00-0,08)
			44	379(100%)	EUR					44	4297 (99,95%)		
			24	0(0%)	EUR					24	2 (0,046%)		
			22	1 (6,25%)					22	0 (0%)			
			44	14 (87,5%)					44	15 (93,75%)			
			24	1 (6,25%)					24	1 (6,25%)			
PDE3A	rs10743380	Allelic Frequency	EUR	2	714 (94,19%)	p=1 OR - 0,52 (95% CI, 0,06-3,92)	PDE8A	rs16974908	Allelic Frequency	EUR	2	10 (1,319%)	p=0,367 OR - 0,41 (95% CI, 0,05-3,33)
			4	44 (5,804%)	EUR					4	748 (98,68%)		
			PRS	2	31 (96,87%)					PRS	2	1 (3,125%)	
			4	1 (3,125%)					4	31 (96,87%)			
PDE3A	rs10743380	Genotype Frequency	EUR	22	336 (88,65%)	p=0,773	PDE8A	rs16974908	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,369 OR - 0,40 (95% CI, 0,04-3,38)
			44	1 (0,263%)	EUR					44	369 (97,36%)		
			24	42 (11,08%)	EUR					24	10 (2,638%)		
			22	15 (93,75%)					22	0 (0%)			
			44	0(0%)					44	15 (93,75%)			
			24	1 (6,25%)					24	1 (6,25%)			
PDE3A	rs10743384	Allelic Frequency	EUR	2	277 (36,54%)	p=0,136 OR - 0,57 (95% CI, 0,28-1,16)	PDE8A	rs35666574	Allelic Frequency	EUR	2	29 (3,825%)	p=1 OR - 1,23 (95% CI, 0,16-9,34)
			4	481 (63,45%)	EUR					4	729 (96,17%)		
			PRS	2	16(50%)					PRS	2	1 (3,125%)	
			4	16(50%)					4	31 (96,87%)			
PDE3A	rs10743384	Genotype Frequency	EUR	22	50 (13,19%)	p=0,043	PDE8A	rs35666574	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=1 OR - 1,24 (95% CI, 0,15-9,74)
			44	152 (40,10%)	EUR					44	350 (92,34%)		
			24	177 (46,70%)	EUR					24	29 (7,651%)		
			22	2 (12,5%)					22	0 (0%)			
			44	2 (12,5%)					44	15 (93,75%)			
			24	12(75%)					24	1 (6,25%)			
PDE3A	rs117453345	Allelic Frequency	EUR	2	36 (4,749%)	p=1 OR - 1,54 (95% CI, 0,20-11,6)	PDE8B	rs115599001	Allelic Frequency	EUR	1	10 (1,319%)	p=0,081 OR - 0,20 (95% CI, 0,04-0,95)
			4	722 (95,25%)	EUR					3	748 (98,68%)		
			PRS	2	1 (3,125%)					PRS	1	2 (6,25%)	
			4	31 (96,87%)					3	30 (93,75%)			
PDE3A	rs117453345	Genotype Frequency	EUR	22	1 (0,263%)	p=0,886	PDE8B	rs115599001	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,080 OR - 0,18 (95% CI, 0,03-0,94)
			44	344 (90,76%)	EUR					33	369 (97,36%)		
			24	34 (8,970%)	EUR					13	10 (2,638%)		
			22	0(0%)					11	0 (0%)			
			44	15 (93,75%)					33	14 (87,5%)			
			24	1 (6,25%)					13	2 (12,5%)			

Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance
PDE3A	rs71539448	Allelic Frequency	EUR	1	54 (7,124%)	p=1 OR - 1,15 (95% CI, 0,26-4,94)	PDE8B	rs182775622	Allelic Frequency	EUR	1	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)
			3	704 (92,87%)	3					758 (100%)			
			PRS	1	2 (6,25%)					1	1 (3,125%)		
			3	30 (93,75%)					3	31 (96,87%)			
PDE3A	rs71539448	Genotype Frequency	EUR	11	2 (0,527%)	p=0,916	PDE8B	rs182775622	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)
			33	327 (86,27%)	33					379 (100%)			
			13	50 (13,19%)	13					0 (0%)			
			11	0 (0%)					11	0 (0%)			
			PRS	33	14 (87,5%)				PRS	33	15 (93,75%)		
			13	2 (12,5%)					13	1 (6,25%)			
PDE3A	rs78782960	Allelic Frequency	EUR	1	84 (11,08%)	p=1 OR - 1,20 (95% CI, 0,35-4,04)	PDE8B	rs186753	Allelic Frequency	EUR	2	0 (0%)	p=
			3	674 (88,91%)	4					758 (100%)			
			PRS	1	3 (9,375%)					2	0 (0%)		
			3	29 (90,62%)					4	32 (100%)			
PDE3A	rs78782960	Genotype Frequency	EUR	11	4 (1,055%)	p=0,837	PDE8B	rs186753	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=
			33	299 (78,89%)	EUR					44	379 (100%)		
			13	76 (20,05%)	24					0 (0%)			
			11	0 (0%)					22	0 (0%)			
			PRS	33	13 (81,25%)				PRS	44	16 (100%)		
			13	3 (18,75%)					24	0 (0%)			
PDE3B	rs1247719	Allelic Frequency	EUR	2	0 (0%)	p=	PDE8B	rs335614	Allelic Frequency	EUR	1	253 (33,37%)	p=0,442 OR - 1,50 (95% CI, 0,66-3,39)
			4	758 (100%)	3					505 (66,62%)			
			PRS	2	0 (0%)					1	8 (25%)		
			4	32 (100%)					3	24 (75%)			
PDE3B	rs1247719	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=	PDE8B	rs335614	Genotype Frequency	EUR	11	37 (9,762%)	p=0,196
			44	379 (100%)	EUR					33	163 (43,00%)		
			24	0 (0%)	13					179 (47,22%)			
			22	0 (0%)					11	0 (0%)			
			PRS	44	16 (100%)				PRS	33	8 (50%)		
			24	0 (0%)					13	8 (50%)			
PDE3B	rs1247720	Allelic Frequency	EUR	2	0 (0%)	p=	PDE8B	rs40594	Allelic Frequency	EUR	1	362 (47,75%)	p=0,473 OR - 1,33 (95% CI, 0,65-2,74)
			4	758 (100%)	3					396 (52,24%)			
			PRS	2	0 (0%)					1	13 (40,62%)		
			4	32 (100%)					3	19 (59,37%)			
PDE3B	rs1247720	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=	PDE8B	rs40594	Genotype Frequency	EUR	11	88 (23,21%)	p=0,305
			44	379 (100%)	EUR					33	105 (27,70%)		
			24	0 (0%)	13					186 (49,07%)			
			22	0 (0%)					11	4 (25%)			
			PRS	44	16 (100%)				PRS	33	7 (43,75%)		
			24	0 (0%)					13	5 (31,25%)			
PDE3B	rs4757268	Allelic Frequency	EUR	1	307 (40,50%)	p=1 OR - 0,99 (95% CI, 0,48-2,04)	PDE8B	rs62362531	Allelic Frequency	EUR	2	133 (17,54%)	p=0,337 OR - 2,05 (95% CI, 0,61-6,85)
			3	451 (59,49%)	4					625 (82,45%)			
			PRS	1	13 (40,62%)					2	3 (9,375%)		
			3	19 (59,37%)					4	29 (90,62%)			
PDE3B	rs4757268	Genotype Frequency	EUR	11	59 (15,56%)	p=0,882	PDE8B	rs62362531	Genotype Frequency	EUR	22	10 (2,638%)	p=0,375
			33	131 (34,56%)	EUR					44	256 (67,54%)		
			13	189 (49,86%)	24					113 (29,81%)			
			11	3 (18,75%)					22	0 (0%)			
			33	6 (37,5%)					44	13 (81,25%)			
			13	7 (43,75%)					24	3 (18,75%)			
PDE4A	rs1051738	Allelic Frequency	EUR	1	123 (16,22%)	p=0,457 OR - 1,87 (95% CI, 0,56-6,24)	PDE9A	rs1045382	Allelic Frequency	EUR	2	492 (64,90%)	p=0,455 OR - 0,72 (95% CI, 0,33-1,58)
			4	635 (83,77%)	4					266 (35,09%)			
			PRS	1	3 (9,375%)					2	23 (71,87%)		
			4	29 (90,62%)					4	9 (28,12%)			
PDE4A	rs1051738	Genotype Frequency	EUR	11	10 (2,638%)	p=0,464	PDE9A	rs1045382	Genotype Frequency	EUR	22	158 (41,68%)	p=0,683
			44	266 (70,18%)	EUR					44	45 (11,87%)		
			14	103 (27,17%)	24					176 (46,43%)			
			11	0 (0%)					22	8 (50%)			
			PRS	44	13 (81,25%)				PRS	44	1 (6,25%)		
			14	3 (18,75%)					24	7 (43,75%)			
PDE4A	rs138164292	Allelic Frequency	EUR	2	3 (2,205%)	p=0,241 OR - 0,33 (95% CI, 0,05-2,11)	PDE9A	rs13047953	Allelic Frequency	EUR	2	357 (47,09%)	p=0,102 OR - 1,95 (95% CI, 0,91-4,19)
			4	133 (97,79%)	4					401 (52,90%)			
			PRS	2	2 (6,25%)					2	10 (31,25%)		
			4	30 (93,75%)					4	22 (68,75%)			
PDE4A	rs138164292	Genotype Frequency	EUR	22	1 (1,470%)	p=0,495	PDE9A	rs13047953	Genotype Frequency	EUR	22	79 (20,84%)	p=0,037
			44	66 (97,05%)	EUR					44	101 (26,64%)		
			24	1 (1,470%)	24					199 (52,50%)			
			22	1 (6,25%)					22	3 (18,75%)			
			PRS	44	15 (93,75%)				PRS	44	9 (56,25%)		
			24	0 (0%)					24	4 (25%)			
PDE4A	rs141286487	Allelic Frequency	EUR	2	6 (0,791%)	p=0,252 OR - 0,24 (95% CI, 0,02-2,11)	PDE9A	rs2269153	Allelic Frequency	EUR	1	244 (32,18%)	p=0,847 OR - 0,90 (95% CI, 0,43-1,90)
			4	752 (99,20%)	3					514 (67,81%)			
			PRS	2	1 (3,125%)					1	11 (34,37%)		
			4	31 (96,87%)					3	21 (65,62%)			
PDE4A	rs141286487	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,253 OR - 0,24 (95% CI, 0,02-2,13)	PDE9A	rs2269153	Genotype Frequency	EUR	11	43 (11,34%)	p=0,966
			44	373 (98,41%)	EUR					33	178 (46,96%)		
			24	6 (1,583%)	13					158 (41,68%)			
			22	0 (0%)					11	2 (12,5%)			
			PRS	44	15 (93,75%)				PRS	33	7 (43,75%)		
			24	1 (6,25%)					13	7 (43,75%)			
PDE4A	rs74453701	Allelic Frequency	EUR	3	712 (93,93%)	p=1 OR - 1,03 (95% CI, 0,23-4,45)	PDE9A	rs3087994	Allelic Frequency	EUR	1	492 (64,90%)	p=0,455 OR - 0,72 (95% CI, 0,33-1,58)
			4	46 (6,068%)	4					266 (35,09%)			
			PRS	3	30 (93,75%)					1	23 (71,87%)		
			4	2 (6,25%)					4	9 (28,12%)			
PDE4A	rs74453701	Genotype Frequency	EUR	33	334 (88,12%)	p=0,954	PDE9A	rs3087994	Genotype Frequency	EUR	11	158 (41,68%)	p=0,683
			44	1 (0,263%)	EUR					44	45 (11,87%)		
			34	44 (11,60%)	14					176 (46,43%)			
			33	14 (87,5%)					11	8 (50%)			
			44	0 (0%)					44	1 (6,25%)			
			34	2 (12,5%)					14	7 (43,75%)			

Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance
PDE4B	rs114408173	Allelic Frequency	EUR	1	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	PDE9A	rs71320554	Allelic Frequency	EUR	2	28 (3,693%)	p=1 OR - 1,18 (95% CI, 0,15-9,02)
			3	758 (100%)	4					730 (96,30%)			
			PRS	1	1 (3,125%)					2	1 (3,125%)		
			3	31 (96,87%)					4	31 (96,87%)			
PDE4B	rs114408173	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)	PDE9A	rs71320554	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=1 OR - 1,19 (95% CI, 0,15-9,39)
			33	379 (100%)	44					351 (92,61%)			
			13	0 (0%)	24					28 (7,387%)			
			11	0 (0%)					22	0 (0%)			
			33	15 (93,75%)					44	15 (93,75%)			
			13	1 (6,25%)					24	1 (6,25%)			
PDE4B	rs200851592	Allelic Frequency	EUR	3	0 (7%)	p=	PDE10A	rs220740	Allelic Frequency	EUR	2	181 (23,87%)	p=0,397 OR - 0,69 (95% CI, 0,32-1,48)
			4	0 (7%)	4					577 (76,12%)			
			PRS	3	16 (50%)					2	10 (31,25%)		
			4	16 (50%)					4	22 (68,75%)			
PDE4B	rs200851592	Genotype Frequency	EUR	33	??? (7%)	p=	PDE10A	rs220740	Genotype Frequency	EUR	22	15 (3,957%)	p=0,135
			44	??? (7%)	44					213 (56,20%)			
			34	??? (7%)	24					151 (39,84%)			
			33	1 (6,25%)					22	0 (0%)			
			44	1 (6,25%)					44	6 (37,5%)			
			34	14 (87,5%)					24	10 (62,5%)			
PDE4B	rs34492439	Allelic Frequency	EUR	2	8600 (100%)	p=0,003 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	PDE10A	rs73022128	Allelic Frequency	EUR	2	679 (89,57%)	p=1 OR - 0,88 (95% CI, 0,26-2,98)
			4	0 (0%)	4					79 (10,42%)			
			PRS	2	31 (96,87%)					2	29 (90,62%)		
			4	1 (3,125%)					4	3 (9,375%)			
PDE4B	rs34492439	Genotype Frequency	EUR	22	4300 (100%)	p=0,003 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)	PDE10A	rs73022128	Genotype Frequency	EUR	22	304 (80,21%)	p=0,846
			44	0 (0%)	44					4 (1,055%)			
			24	0 (0%)	24					71 (18,73%)			
			22	15 (93,75%)					22	13 (81,25%)			
			44	0 (0%)					44	0 (0%)			
			24	1 (6,25%)					24	3 (18,75%)			
PDE4B	rs7534999	Allelic Frequency	EUR	2	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	PDE10A	rs77122094	Allelic Frequency	EUR	1	11 (1,451%)	p=0,093 OR - 0,22 (95% CI, 0,04-1,04)
			4	758 (100%)	2					747 (98,54%)			
			PRS	2	1 (3,125%)					1	2 (6,25%)		
			4	31 (96,87%)					2	30 (93,75%)			
PDE4B	rs7534999	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,040 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)	PDE10A	rs77122094	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,092 OR - 0,20 (95% CI, 0,04-1,03)
			44	379 (100%)	12					11 (2,902%)			
			24	0 (0%)	11					0 (0%)			
			44	15 (93,75%)					22	14 (87,5%)			
			24	1 (6,25%)					12	2 (12,5%)			
PDE4B	rs75398902	Allelic Frequency	EUR	3	13 (1,715%)	p=0,442 OR - 0,54 (95% CI, 0,06-4,26)	PDE10A	rs79469867	Allelic Frequency	EUR	2	654 (86,27%)	p=1 OR - 0,89 (95% CI, 0,30-2,61)
			4	745 (98,28%)	4					104 (13,72%)			
			PRS	3	1 (3,125%)					2	28 (87,5%)		
			4	31 (96,87%)					4	4 (12,5%)			
PDE4B	rs75398902	Genotype Frequency	EUR	33	0 (0%)	p=0,445 OR - 0,53 (95% CI, 0,06-4,34)	PDE10A	rs79469867	Genotype Frequency	EUR	22	283 (74,67%)	p=0,710
			44	366 (96,56%)	44					8 (2,110%)			
			34	13 (3,430%)	24					88 (23,21%)			
			33	0 (0%)					22	12 (75%)			
			44	15 (93,75%)					44	0 (0%)			
			34	1 (6,25%)					24	4 (25%)			
PDE4B	rs783036	Allelic Frequency	EUR	1	378 (49,86%)	p=1 OR - 0,99 (95% CI, 0,49-2,01)	PDE10A	rs9459421	Allelic Frequency	EUR	2	720 (94,98%)	p=0,227 OR - 1,96 (95% CI, 0,57-6,72)
			3	380 (50,13%)	4					38 (5,013%)			
			PRS	1	16 (50%)					2	29 (90,62%)		
			3	16 (50%)					4	3 (9,375%)			
PDE4B	rs783036	Genotype Frequency	EUR	11	87 (22,95%)	p=0,438	PDE10A	rs9459421	Genotype Frequency	EUR	22	342 (90,23%)	p=0,525
			33	88 (23,21%)	44					1 (0,263%)			
			13	204 (53,82%)	24					36 (9,498%)			
			11	5 (31,25%)					22	13 (81,25%)			
			33	5 (31,25%)					44	0 (0%)			
			13	6 (37,5%)					24	3 (18,75%)			
PDE4B	rs783039	Allelic Frequency	EUR	1	199 (26,25%)	p=0,158 OR - 0,59 (95% CI, 0,28-1,23)	PDE11A	rs1047884	Allelic Frequency	EUR	3	575 (75,85%)	p=1 OR - 1,04 (95% CI, 0,46-2,37)
			3	559 (73,74%)	4					183 (24,14%)			
			PRS	1	12 (37,5%)					3	24 (75%)		
			3	20 (62,5%)					4	8 (25%)			
PDE4B	rs783039	Genotype Frequency	EUR	11	24 (6,332%)	p=0,057	PDE11A	rs1047884	Genotype Frequency	EUR	33	213 (56,20%)	p=0,947
			33	204 (53,82%)	44					17 (4,485%)			
			13	151 (39,84%)	34					149 (39,31%)			
			11	4 (25%)					33	9 (56,25%)			
			33	8 (50%)					44	1 (6,25%)			
			13	4 (25%)					34	6 (37,5%)			
PDE4C	rs783039	Allelic Frequency	EUR	2	288 (37,99%)	p=0,578 OR - 0,78 (95% CI, 0,38-1,60)	PDE11A	rs115616942	Allelic Frequency	EUR	1	2 (0,263%)	p=0,116 OR - 0,08 (95% CI, 0,00-0,92)
			4	470 (62,00%)	4					756 (99,73%)			
			PRS	2	14 (43,75%)					1	1 (3,125%)		
			4	18 (56,25%)					4	31 (96,87%)			
PDE4C	rs783039	Genotype Frequency	EUR	22	58 (15,30%)	p=0,600	PDE11A	rs115616942	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,116 OR - 0,07 (95% CI, 0,00-0,92)
			44	149 (39,31%)	14					2 (0,527%)			
			24	172 (45,38%)	11					0 (0%)			
			22	4 (25%)					44	15 (93,75%)			
			44	6 (37,5%)					14	1 (6,25%)			
			24	6 (37,5%)					14	1 (6,25%)			
PDE4D	rs11950492	Allelic Frequency	EUR	1	637 (84,03%)	p=1 OR - 0,97 (95% CI, 0,36-2,58)	PDE11A	rs115662866	Allelic Frequency	EUR	1	10 (1,319%)	p=0,367 OR - 0,41 (95% CI, 0,05-3,33)
			3	121 (15,96%)	3					748 (98,68%)			
			PRS	1	27 (84,37%)					1	1 (3,125%)		
			3	5 (15,62%)					3	31 (96,87%)			
PDE4D	rs11950492	Genotype Frequency	EUR	11	268 (70,71%)	p=0,621	PDE11A	rs115662866	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,369 OR - 0,40 (95% CI, 0,04-3,38)
			33	10 (2,638%)	13					10 (2,638%)			
			13	101 (26,64%)	11					0 (0%)			
			11	11 (68,75%)					33	15 (93,75%)			
			33	0 (0%)					13	1 (6,25%)			
			13	5 (31,25%)					13	1 (6,25%)			

Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance
PDE4D	rs11950495	Allelic Frequency	EUR	1	692 (91,29%)	p=0,753 OR - 1,08 (95% CI, 0,32-3,65)	PDE11A	rs13012088	Allelic Frequency	EUR	1	110(14,51%)	p=0,071 OR - 5,26 (95% CI, 0,71-38,9)
			PRS	3	66 (8,707%)					PRS	1	1 (3,125%)	
			3	3 (9,375%)	3					31 (96,87%)			
PDE4D	rs11950495	Genotype Frequency	EUR	11	315 (83,11%)	p=0,894	PDE11A	rs13012088	Genotype Frequency	EUR	11	11 (2,902%)	p=0,111
			33	2 (0,527%)	33					280(73,87%)			
			13	62 (16,35%)	13					88 (23,21%)			
PDE4D	rs11959349	Allelic Frequency	EUR	1	637 (84,03%)	p=0,805 OR - 0,75 (95% CI, 0,25-2,18)	PDE11A	rs1435573	Allelic Frequency	EUR	2	101(13,32%)	p=0,108 OR - 4,76 (95% CI, 0,64-35,2)
			PRS	4	121 (15,96%)					PRS	3	657(86,67%)	
			4	4 (12,5%)	3					31 (96,87%)			
PDE4D	rs11959349	Genotype Frequency	EUR	11	268 (70,71%)	p=0,643	PDE11A	rs1435573	Genotype Frequency	EUR	22	6 (1,583%)	p=0,138
			44	10 (2,638%)	33					284(74,93%)			
			14	101 (26,64%)	23					89 (23,48%)			
PDE4D	rs1553114	Allelic Frequency	EUR	2	617 (81,39%)	p=1 OR - 1,00 (95% CI, 0,40-2,49)	PDE11A	rs2293473	Allelic Frequency	EUR	1	40 (5,277%)	p=0,096 OR - 0,35 (95% CI, 0,13-1,16)
			PRS	4	141 (18,60%)					PRS	3	718(94,72%)	
			2	26 (81,25%)	1					4 (12,5%)			
PDE4D	rs1553114	Genotype Frequency	EUR	22	253 (66,75%)	p=0,868	PDE11A	rs2293473	Genotype Frequency	EUR	33	339(89,44%)	p=0,089 OR - 0,38 (95% CI, 0,10-1,14)
			PRS	44	15 (3,957%)					13	40 (10,55%)		
			24	111 (29,28%)	11					0 (0%)			
PDE4D	rs72769729	Allelic Frequency	EUR	2	63 (8,311%)	p=0,505 OR - 2,81 (95% CI, 0,37-20,9)	PDE11A	rs3821010	Allelic Frequency	EUR	1	524(69,12%)	p=0,846 OR - 0,87 (95% CI, 0,39-1,92)
			PRS	4	695 (91,68%)					PRS	3	234(30,87%)	
			2	1 (3,125%)	1					23 (71,87%)			
PDE4D	rs72769729	Genotype Frequency	EUR	22	1 (0,263%)	p=0,476	PDE11A	rs3821010	Genotype Frequency	EUR	11	182(48,02%)	p=0,152
			PRS	44	317 (83,64%)					33	37 (9,762%)		
			24	61 (16,09%)	13					160(42,21%)			
PDE5A	rs11947234	Allelic Frequency	EUR	1	555 (71,52%)	p=0,547 OR - 0,83 (95% CI, 0,51-1,36)	PDE11A	rs6433711	Allelic Frequency	EUR	2	757(99,86%)	p=1 OR - 0,99 (95% CI, 0,99-1,00)
			PRS	3	221 (28,47%)					PRS	4	1 (0,131%)	
			1	72 (75%)	2					32 (100%)			
PDE5A	rs11947234	Genotype Frequency	EUR	11	198 (51,03%)	p=0,224	PDE11A	rs6433711	Genotype Frequency	EUR	22	378(99,73%)	p=1 OR - 0,99 (95% CI, 0,99-1,00)
			33	31 (7,989%)	44					0 (0%)			
			13	159 (40,97%)	24					1 (0,263%)			
PDE5A	rs142272118	Allelic Frequency	EUR	2	6 (0,791%)	p=0,252 OR - 0,24 (95% CI, 0,02-2,11)	PDE11A	rs6720891	Allelic Frequency	EUR	2	524(69,12%)	p=0,560 OR - 0,74 (95% CI, 0,33-1,68)
			PRS	4	752 (99,20%)					PRS	2	24 (75%)	
			2	1 (3,125%)	4					8 (25%)			
PDE5A	rs142272118	Genotype Frequency	EUR	22	1 (0,263%)	p=0,394	PDE11A	rs6720891	Genotype Frequency	EUR	22	182(48,02%)	p=0,773
			PRS	44	374 (98,68%)					44	37 (9,762%)		
			24	4 (1,055%)	24					160(42,21%)			
PDE5A	rs144204269	Allelic Frequency	EUR	2	758 (100%)	p=0,112 OR - 1,01 (95% CI, 0,98-1,03)	PDE11A	rs71423514	Allelic Frequency	EUR	2	648(85,48%)	p=0,071 OR - 0,19 (95% CI, 0,02-1,40)
			PRS	3	0 (0%)					PRS	4	110(14,51%)	
			2	95 (98,95%)	2					31 (96,87%)			
PDE5A	rs144204269	Genotype Frequency	EUR	22	379 (100%)	p=0,112 OR - 1,02 (95% CI, 0,97-1,06)	PDE11A	rs71423514	Genotype Frequency	EUR	22	280(73,87%)	p=0,111
			PRS	33	0 (0%)					44	11 (2,902%)		
			23	47 (97,91%)	24					88 (23,21%)			
PDE5A	rs148360694	Allelic Frequency	EUR	2	1 (0,131%)	p=0,079 OR - 0,04 (95% CI, 0,00-0,67)	PDE11A	rs71423544	Allelic Frequency	EUR	1	100(13,19%)	p=0,108 OR - 4,71 (95% CI, 0,63-34,8)
			PRS	4	757 (99,86%)					PRS	1	1 (3,125%)	
			2	1 (3,125%)	4					31 (96,87%)			
PDE5A	rs148360694	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,079 OR - 0,03 (95% CI, 0,00-0,66)	PDE11A	rs71423544	Genotype Frequency	EUR	11	6 (1,583%)	p=0,144
			PRS	44	378 (99,73%)					44	285 (75,19%)		
			24	1 (0,263%)	14					88 (23,21%)			
PDE5A	rs17051276	Allelic Frequency	EUR	1	730 (96,30%)	p=0,775 OR - 1,13 (95% CI, 0,38-3,30)	PDE11A	rs75461311	Allelic Frequency	EUR	1	754(99,47%)	p=0,000 OR - 26,9 (95% CI, 6,40-113,)
			PRS	4	28 (3,693%)					PRS	3	4 (12,5%)	
			1	92 (95,83%)	4					4 (12,5%)			
PDE5A	rs17051276	Genotype Frequency	EUR	11	351 (92,61%)	p=0,771 OR - 1,13 (95% CI, 0,38-3,40)	PDE11A	rs75461311	Genotype Frequency	EUR	11	375(98,94%)	p=0,000 OR - 31,2 (95% CI, 6,97-140,)
			PRS	44	0 (0%)					33	0 (0%)		
			14	28 (7,387%)	13					4 (1,055%)			
PDE5A	rs17051276	Genotype Frequency	EUR	11	44 (91,66%)	p=0,771 OR - 1,13 (95% CI, 0,38-3,40)	PDE11A	rs75461311	Genotype Frequency	EUR	11	12 (75%)	p=0,000 OR - 31,2 (95% CI, 6,97-140,)
			PRS	44	0 (0%)					33	0 (0%)		
			14	4 (8,333%)	13					4 (25%)			

Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance	Gene	RS	Type	Pop	ALE/Gen	N	Significance
PDE5A	rs3733526	Allelic Frequency	EUR	1	606 (79,94%)	p=0,052 OR - 0,51 (95% CI, 0,26-0,99)	PDE11A	rs75672043	Allelic Frequency	EUR	1	94 (12,40%)	p=0,412 OR - 2,12 (95% CI, 0,49-9,03)
			3	152 (20,05%)	3					664 (87,59%)			
			PRS	1	85 (88,54%)					PRS	1	2 (6,25%)	
			3	11 (11,45%)			3	30 (93,75%)					
PDE5A	rs3733526	Genotype Frequency	EUR	11	237 (62,53%)	p=0,059	PDE11A	rs75672043	Genotype Frequency	EUR	11	7 (1,846%)	p=0,490
			33	10 (2,638%)	33					292 (77,04%)			
			13	132 (34,82%)	13					80 (21,10%)			
			11	38 (79,16%)				11	0 (0%)				
			PRS	33	1 (2,083%)				PRS	33	14 (87,5%)		
			13	9 (18,75%)					13	2 (12,5%)			
PDE5A	rs1045177	Allelic Frequency	EUR	1	24 (3,166%)	p=0,284 OR - 0,49 (95% CI, 0,11-2,17)	PDE11A	rs77597060	Allelic Frequency	EUR	2	757 (99,86%)	p=0,079 OR - 24,4 (95% CI, 1,49-399,)
			3	734 (96,83%)	4					1 (0,131%)			
			PRS	1	2 (6,25%)					PRS	2	31 (96,87%)	
			3	30 (93,75%)				4	1 (3,125%)				
PDE5A	rs1045177	Genotype Frequency	EUR	11	1 (0,263%)	p=0,597	PDE11A	rs77597060	Genotype Frequency	EUR	22	378 (99,73%)	p=0,079 OR - 25,2 (95% CI, 1,50-422,)
			33	356 (93,93%)	44					0 (0%)			
			13	22 (5,804%)	24					1 (0,263%)			
			11	0 (0%)				22	15 (93,75%)				
			PRS	33	14 (87,5%)				PRS	44	0 (0%)		
			13	2 (12,5%)					24	1 (6,25%)			
PDE5A	rs114886951	Allelic Frequency	EUR	1	757 (99,86%)	p=0,034 OR - 16,1 (95% CI, 1,44-179,)	PDE11A	rs79903863	Allelic Frequency	EUR	1	0 (0%)	p=0,000 OR - 1,23 (95% CI, 0,98-1,23)
			3	1 (0,131%)	4					758 (100%)			
			PRS	1	94 (97,91%)					PRS	1	3 (9,375%)	
			3	2 (2,083%)				4	29 (90,62%)				
PDE5A	rs114886951	Genotype Frequency	EUR	11	378 (99,73%)	p=0,034 OR - 16,1 (95% CI, 1,46-184,)	PDE11A	rs79903863	Genotype Frequency	EUR	11	0 (0%)	p=0,000 OR - 0,97-1,55)
			33	0 (0%)	44					379 (100%)			
			13	1 (0,263%)	14					0 (0%)			
			11	46 (95,83%)				11	0 (0%)				
			PRS	33	0 (0%)				PRS	44	13 (81,25%)		
			13	2 (4,166%)				14	3 (18,75%)				
PDE5A	rs3733523	Allelic Frequency	EUR	2	218 (28,75%)	p=0,632 OR - 1,14 (95% CI, 0,70-1,85)	PDE11A	rs10201180	Allelic Frequency	EUR	2	187 (24,67%)	p=0,142 OR - 0,54 (95% CI, 0,26-1,13)
			4	540 (71,24%)	4					571 (75,32%)			
			PRS	2	25 (26,04%)					PRS	2	12 (37,5%)	
			4	71 (73,95%)				4	20 (62,5%)				
PDE5A	rs3733523	Genotype Frequency	EUR	22	30 (7,915%)	p=0,215	PDE11A	rs10201180	Genotype Frequency	EUR	22	19 (5,013%)	p=0,268
			44	191 (50,39%)	44					211 (55,67%)			
			24	158 (41,68%)	24					149 (39,31%)			
			22	1 (2,083%)				22	2 (12,5%)				
			PRS	44	24 (50%)				PRS	44	6 (37,5%)		
			24	23 (47,91%)				24	8 (50%)				
PDE5A	rs3733524	Allelic Frequency	EUR	2	540 (71,24%)	p=0,399 OR - 0,78 (95% CI, 0,47-1,27)	PDE11A	rs17400325	Allelic Frequency	EUR	2	710 (93,66%)	p=1 OR - 0,98 (95% CI, 0,22-4,24)
			4	218 (28,75%)	4					48 (6,332%)			
			PRS	2	73 (76,04%)					PRS	2	30 (93,75%)	
			4	23 (23,95%)				4	2 (6,25%)				
PDE5A	rs3733524	Genotype Frequency	EUR	22	191 (50,39%)	p=0,240	PDE11A	rs17400325	Genotype Frequency	EUR	22	331 (87,33%)	p=1 OR - 0,98 (95% CI, 0,21-4,46)
			44	30 (7,915%)	44					0 (0%)			
			24	158 (41,68%)	24					48 (12,66%)			
			22	26 (54,16%)				22	14 (87,5%)				
			PRS	44	1 (2,083%)				PRS	44	0 (0%)		
			24	21 (43,75%)				24	2 (12,5%)				
PDE6A	rs113309832	Allelic Frequency	EUR	2	0 (0%)	p=0,038 OR - 1,03 (95% CI, 0,96-1,09)	PDE11A	rs75127279	Allelic Frequency	EUR	2	20 (2,638%)	p=0,343 OR - 0,63 (95% CI, 0,21-1,90)
			4	794 (100%)	4					738 (97,36%)			
			PRS	2	1 (3,125%)					PRS	2	4 (4,081%)	
			4	31 (96,87%)				4	94 (95,91%)				
PDE6A	rs113309832	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,038 OR - 1,06 (95% CI, 0,93-1,21)	PDE11A	rs75127279	Genotype Frequency	EUR	22	0 (0%)	p=0,107
			44	397 (100%)	44					359 (94,72%)			
			24	0 (0%)	24					20 (5,277%)			
			22	0 (0%)				22	1 (2,040%)				
			PRS	44	15 (93,75%)				PRS	44	46 (93,87%)		
			24	1 (6,25%)				24	2 (4,081%)				

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1 - PROTOCOLO POR SECUENCIAMIENTO POR SOLID



### MOLECULAR GENETICS LAB (MGL)

National Institutes of Health, Eunice Kennedy Shriver National  
 Institute of Child Health and Human Development (NICHD)  
 10 Center Dr, CRC, Rm 1E-3289, Bethesda, MD, 20892  
 Tel: (301) 435-4432 Fax: (301) 480 5791  
 CLIA ID#: 21D2007566  
 Director: Forbes D Porter, MD, PhD



## EXPERIMENT FORM

MGL-NICHD Form 02\_ NGS\_PAIRED ENDS Non-Multiplexed EZB 8 Samples

*Before to begin, read "General Instructions for MGL-NICHD Form 02\_ PAIRED ENDS MULTIPLEX EZB completion" on Page 3*

**Sample Information\***

Medical record#	Specimen ID#
DNA source extracted	Date DNA was
DNA concentration (ng/ul)	DNA amount (ul)
NIH Protocol#	

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**MGL-NICHD Sample Information**

MGL#

Barcode

Location

DNA concentration (ng/ul)    DNA amount (ul)  
   

Accepted

Rejected

Substandard

Analysis requested on substandard sample

Gene/Disease  
 (\*or check box from the Test Selection box on pages 2 and 3)

Testing for known mutation     MGL ID# of relative

Mutation     Gene

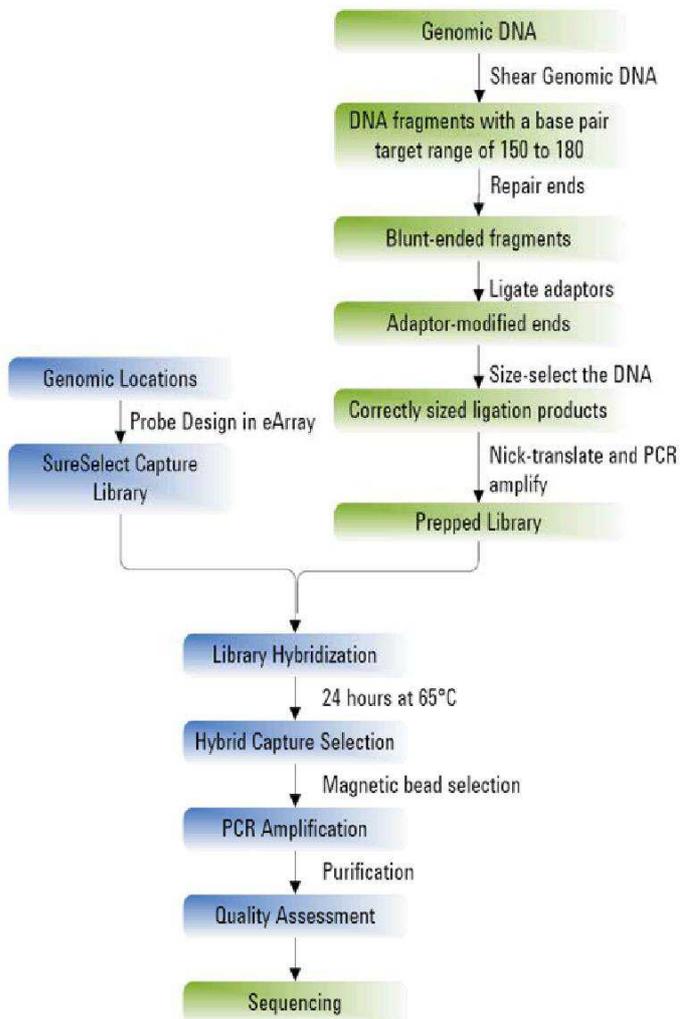
Priority testing (Please indicate the reason below, and contact us prior to sending the sample)

The sample to be tested, even if "substandard" (no results guaranteed)

## GENERAL RULES FOR EXPERIMENTAL FORM COMPLETION

- 1) Complete one MGL-NICHD Experiment Form 02\_NGS for every Solid run.
- 2) Up to 16 samples can be processed in one Solid run; for each sample, complete additional pages 1-2 from the same MGL-NICHD Experiment Form 02\_NGS.
- 3) Check every step upon completion.
- 4) Any relevant issues to the experiment step should be described in the field "NOTES" following every step.
- 5) If certain measurement is to be repeated, please repeat and describe the reason in details in the field "NOTES".
- 6) In the incorporated tables, type the MGL# in the GREEN cells ONLY and insert data in the BLUE cells ONLY; the output values to be used will be automatically calculated in the YELLOW cells.
- 7) In the tables listing reagents to be mixed, always include 10% extra reaction number to correct for pipeting errors.
- 8) Before to begin, confirm that all the required reagents are at hand and with an appropriate expiration date; indicate the Lot#, the date of opening and the expiration date. If no expiration date is indicated by the vendor, assume expiration date exactly 1 year after the date of opening.
- 9) Before to begin, confirm the availability of the following commonly used consumables and equipment:
  - ✓ Nuclease-free water (not DEPC treated), Ambion Cat#AM9930
  - ✓ LoBind tubes, 1.5 ml, Eppendorf Cat#022431021
  - ✓ Research pipettes P10, P20, P200 and P1000
  - ✓ Multichannel Research pipettes 8-channel and 12 channel
  - ✓ Ice bucket
  - ✓ Powder Free gloves
  - ✓ PCR plates
  - ✓ PCR strip caps or equivalent
  - ✓ MicroAmp Clear Adhesive Film, Applied Biosystems Cat# 4306311
  - ✓ Sterile, nuclease free aerosol barrier tips
  - ✓ Timer
  - ✓ Vortex mixer
  - ✓ Bench-top microcentrifuge
  - ✓ Eppendorf microcentrifuge Model 5417, Eppendorf Cat#022621807
  - ✓ Eppendorf fixed-angle rotor with standard lid, Eppendorf Cat#022636006
  - ✓ Eppendorf Termomixer R, Eppendorf Cat#022636006
  - ✓ Thermal Cycler, Bio-Rad Cat#PTC-200
  - ✓ Qubit Fluorometer, Invitrogen Cat#Q32857
  - ✓ E-Gel iBase with E-Gel Safe Imager, Invitrogen Cat#G6465
  - ✓ Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Cat#G2938C
  - ✓ Covaris S-series, Model S2
  - ✓ Dynal Magnetic separator, Invitrogen Cat#123-21D
  - ✓ Nutator or equivalent
  - ✓ NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific Cat# ND-1000
  - ✓ TECAN robotic system, EVO75
  - ✓ 15 ml Falcon tubes
  - ✓ Axygen 1.5 ml screw tubes & caps
  - ✓ SOLiD 4 System, Applied Biosystems Cat#4452773

**Workflow:**



**EasyBead System:**

**Eulsion PCR (EMULSYFIER & AMPLIFIER)**

**Bead Enrrichment (ENRICHER)**

**Quality and Quantity Assesment**

**Bead Deposition**

**Set up and perform of the sequencing run**

**Monitor and Control the run**

**Workflow (cont):**

**Step 1.** Quantify and shear DNA.

**Step 2.** Apply TECAN script "Lib\_Express\_part1" to Repair the ends and purify the DNA with Ampure Beads **Step 3.** Apply TECAN script "Lib\_Express\_part2" to Ligate the Adaptors to the DNA and purify the DNA with Ampure Beads.

**Step 4.** Size-select the DNA fragments with a SOLiD Library Size Selection gel; purify the DNA.

**Step 4.** Nick-translate and amplify the library

**Step 5.** Apply TECAN script "Lib\_Express\_part3\_12maxL" to purify the Nick translated and purified DNA with Ampure Beads.

**Step 6.** Quantify the Library with the Agilent 2100 Bioanalyzer.

**Step 7.** Hybridize the library.

**Step 8.** Apply TECAN script "Lib\_Express\_part4\_12maxR" to purify the Hybridized DNA with Ampure Beads. **Step 9.** Prepare the magnetic beads and Select hybrid capture with SureSelect.

**Step 10.** Amplify the sample

**Step 11.** Apply TECAN script "Lib\_Express\_part4\_12maxR" to purify the Hybridized DNA with Ampure Beads.

**Step 12.** Quantify the library with the Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity kit. **Step 13.** Do a quantitative Taqman PCR.

**Step 14.** Prepare the Oil Phase and Pre-rinse the SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier Pouch

**Step 15.** Prepare the Emulsion (E10, EZ Bead Emulsifier).

**Step 16.** Do an emulsion PCR (E10, EZ Bead Amplifier).

**Step 17.** Enrich the beads (E10, EZ Bead Enricher).

**Step 18.** Modify the 3' ends.

**Step 19.** Quantitate the beads with the SOLiD™ Bead Concentration Chart and the NanoDrop® ND-1000. **Step 20.** Deposit the beads on the slides.

**Step 21.** Install on-instrument reagents.

**Step 22.** Install slides on the instrument.

**Step 23.** Install reagent strip(s).

**Step 24.** Set up and perform a sequencing run.

**Step 25.** Monitor and Control the run.

**Equipment Needed**

- ✓ Solid 4 System
- ✓ Qubit Fluorometer
- ✓ Covaris S-series Single Tube Sample Preparation System, Model S2
- ✓ Covaris microTUBE with AFA fiber and snap cap
- ✓ Agilent 2100 Bioanalyser
- ✓ TECAN Robotic system
  
- ✓ Thermal Cycler MJ Research DNA Engine PTC-200
- ✓ Eppendorf Microcentrifuge Model 5417R
- ✓ Eppendorf fixed-angle rotor with standard lid
- ✓ E-Gel iBase and E-Gel Safe Imager Combo Kit
- ✓ Dynal DynaMag-2 magnetic stand
- ✓ Nanodrop ND1000 spectrophotometer
- ✓ SOLiD™ EZ Bead™ Emulsifier
- ✓ SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier
- ✓ SOLiD™ EZ Bead™ Enricher
- ✓ P10, P20, P200 and P1000 pipettes
- ✓ Multichannel pipettes 8 and 12-channels
- ✓ Ice bucket
- ✓ Powder-free gloves
- ✓ 96-well PCR plates
- ✓ Clear Adhesive film
- ✓ PCR strip tubes
- ✓ PCR strip optical strip caps or equivalent
- ✓ Sterile, nuclease-free aerosol barrier pipette tips
- ✓ Timer
- ✓ Vortex mixer
- ✓ Nutator Mixer
- ✓ Picofuge
- ✓ Heat blocks at 37°C and at 65°C

**Vendor**

Applied Bisystems  
 Invitrogen p/n Q32857  
 Covaris  
 Covaris p/n 520045  
 Agilent p/n G2938C  
 TECAN

BioRad  
 Eppendorf p/n 022621807  
 Eppendorf p/n 022636006  
 Invitrogen p/n G6465  
 Invitrogen p/n 123-21D  
 Thermo Scientific  
 Applied Bisystems p/n 4448419  
 Applied Bisystems p/n 4448418  
 Applied Bisystems p/n 4448420

Devido à extensão e número de páginas do anexo o resto do protocolo estará disponível online nos links:

[https://dl.dropboxusercontent.com/u/91881594/MGL-NICHD\\_Exp\\_Form\\_02\\_NGS\\_PE\\_Non-MULTIPLEX\\_EZB\\_8%20samples\\_AH.docx](https://dl.dropboxusercontent.com/u/91881594/MGL-NICHD_Exp_Form_02_NGS_PE_Non-MULTIPLEX_EZB_8%20samples_AH.docx)

<https://skydrive.live.com/?cid=dbaeaa37889ad523&id=DBAEAA37889AD523%21435&action=Share#!/view.aspx?cid=DBAEAA37889AD523&resid=DBAEAA37889AD523%21435&app=Word>

[http://www.4shared.com/file/YNRtJdQc/MGL\\_8\\_samples.html](http://www.4shared.com/file/YNRtJdQc/MGL_8_samples.html)

O protocolo original da Applied Biosystems pode ser encontrado no seguinte link:

[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms\\_065852.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_065852.pdf)

9.2 ANEXO 2 - GENES ANALISADOS POR *AGILENT'S SURESELECT*

PRKAR1A	NPC2	GLI2	OXT	SF1	PDE3B	PTTG1
PDE11A	DHCR7	PATCHED-1	SHANK3	KAL1	PDE4A	TCF4
PDE8B	FMR1	DISP1	NLGN3	FGFR1	PDE4B	GSK3b
AAAS	NR5A1	FOSH1	NLGN4	FGFR2	PDE4C	Wnt1
AR	NLRP5	NODAL	NR3C1	FGFR3	PDE4D	Wnt2
PTPN11	SC5D	EMX2	ESR1	FGFR4	PDE5A	Wnt2B
STK11	DHCR24	SRY	ESR2	FGF8	PDE6A	Wnt5A
MEN1	DHCR14	NR5A1	VDR	NELF	PDE6B	Wnt5B
CTNNB1	NSDHL	DHH	AR	PROK2	PDE6B	Wnt11
NF1	EBP	NROB1	GNRH1	PROKR2	PDE7A	GNAS
SDHB	LBR	WNT4	GNRH2	CDH7	PDE7B	Skp2
SDHD	SC4MOL	LHX9	GNRHR	POU5F1	PDE8A	FUT1
SDHC	POR	PAX6	LHCGR	NANOG	PDE9A	MEG3
RET	NPC1	SOX2	MC2R	TAC3	PDE10A	RHBDD3
VHL	NPC2	SIX6	CRH	TACR3	SFRP1	E2F
CRTAP	TMEM97	OTX2	MC1R	FOXA1	SFRP2	BMP4
LEPRE1	APOE	VSX2	MC3R	FOXA2	SFRP4	VEGFA
PPIB	LC3Alpfa	LHX2	MC4R	FOXD2	PITX2	MMP9
COL1A1	CYP46	PTEN	MC5R	FOXD3	CCND1	GADD45g
COL1A2	CYP27A1	MECP2	POMC	FOXQ1	DLK1	GDF15
MC4R	LXR-alpha	CDKL5	GH1	FOXF1	WIF1	IGF2
ATP7A	LXR-Beta	RAI1	TSHR	FOXF2	FRZB	PWCR
SLC31A1	ABCA1	COH1	TSHB	FOXK2	SOSTDC1	SDH5
ATOX1	ABCG1	RELN	TRH	PDE1A	DKK2	TMEM127
COX17	SHH	FOXP2	TRHR	PDE1B	DKK3	IDH1
HFE	TGIF	MET	POU1F1	PDE1C	FAM5C	IDH2
PPT1	ZIC2	EN2	PROP1	PDE2A	PTX2	
NPC1	SIX3	SLC6A4	NR0B1	PDE3A	MYC	

### 9.3 ANEXO 3 - PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

#### **Ethanol/Sodium Acetate Precipitation protocol for sequencing trays.**

1. For a whole plate add 6mL 95% ethanol and 240 $\mu$ L 3M Sodium Acetate, pH 5.2. Then add 50 $\mu$ L of this mixture to each reaction well, and close the well with strip caps.
2. Mix tray by inverting several times and let sit for 15 minutes (cover with foil).
3. Spin at 3000 rpm for 45 minutes in the centrifuge using tray adaptors.
4. Discard the excess of supernatant by inverting the tray into the sink and spin upside down onto a paper towel at 2000 rpm for 1 minute.
5. Add 150 $\mu$ L of 70% ethanol, cap the wells, invert several times, and spin for an additional 10 minutes at 3700 rpm.
6. Discard the excess of supernatant by inverting the tray into the sink and spin upside down onto a paper towel at 2000 rpm for 1 minute.
7. Precipitated DNA may be stored at -20°C covered with foil to avoid exposure of BD terminators to light).
8. Resuspend in 18 $\mu$ L of Hi-Di Formamide. Use new caps for the wells, mix tray by inverting and spin at 1000-2000 rpm for 1 minute.
9. Denature samples at  $\geq 95^{\circ}\text{C}$  for 2 minutes prior loading. Immediately place samples on ice (Denatured samples may be stored at -20°C for several days).