

Universidade do Porto

Estudo de STR de aplicação forense na etiologia do Cancro da
Próstata

Maria Raquel Diniz Leitão Carvalho

Dissertação realizada no âmbito do Mestrado em Ciências Forenses

Universidade do Porto

Estudo de STR de aplicação forense na etiologia do Cancro da
Próstata

Maria Raquel Diniz Leitão Carvalho

Dissertação realizada no âmbito do Mestrado em Ciências Forenses

Orientador: Professor Doutor Rui Medeiros
Co-orientadora: Professora Doutora Maria de Fátima Pinheiro

Resumo

O cancro da próstata é a patologia mais comum nos homens sendo a segunda causa de morte em países industrializados. Os factores de risco incluem a idade avançada, a etnia e a existência de antecedentes familiares. Apesar dos estudos já realizados, a determinação genética para o cancro da próstata tem sido uma tarefa complexa. Um método de análise do DNA de modo a procurarem-se genes que possam influenciar o desenvolvimento da patologia em causa é o estudo do material genético por *screening* recorrendo a STR (*Short Tandem Repeats*). Este trabalho teve como objectivo estudar Y-STR e X-STR numa tentativa de se identificarem genes de susceptibilidade para o cancro da próstata. Foram escolhidos estes dois cromossomas uma vez que até à data existem diversas evidências que corroboram a existência de material genético nestes que influencia o desenvolvimento deste tipo de cancro. Para tal, o DNA de 315 indivíduos “normais” (população controlo) e de 281 indivíduos com cancro da próstata (população caso) foi analisado recorrendo a 17 Y-STR (AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Y-Filer $^{\text{TM}}$ (Applied Biosystems)) e a 15 X-STR (Argus X-8 (Mentype $^{\text{®}}$)) e Decaplex-X) utilizados diariamente no âmbito da genética forense. A análise estatística foi realizada recorrendo ao *software* SPSS (versão 13.0, SPSS Inc, 2004). Verificou-se que alguns alelos de determinados *loci* poderão desempenhar um papel protector ou de risco no desenvolvimento desta patologia. Os *loci* em causa (DYS458, DYS393, DYS389II, DYS635, DYS385, DYS448, GATA172D05, DXS9902, DXS8378 e DXS10135) poderão estar em desequilíbrio de *linkage* com genes importantes para a célula, nomeadamente genes que estejam envolvidos no crescimento e na regulação do ciclo celular. Deste modo, através deste trabalho foi possível identificar genes que possam contribuir para o desenvolvimento do cancro da próstata.

Abstract

Prostate cancer is the most common malignancy among men in industrialized countries. Advanced age, gender and having a familiar with the disease are risk factors for prostate cancer. Although various studies have already been performed, the genetic determination for this disease isn't already determined. Short Tandem Repeats (STRs) are a useful tool for DNA screening. The aim of this study was to analyze Y-STRs and X-STRs in an attempt to identify susceptibility genes for prostate cancer since various studies have already demonstrated that these chromosomes are implicated in the progression of the disease. The DNA of 315 apparently healthy men (controls) and of 281 men diagnosed with prostate cancer (cases) was analyzed with 17 Y-STRs (AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Y-Filer $^{\text{TM}}$ (Applied Biosystems)) and 15 X-STRs (Argus X-8 (Mentype $^{\circ}$)) and Decaplex-X) commonly used in forensic analysis. Statistics was performed using software SPSS (version 13.0, SPSS Inc, 2004). Some alleles of various loci could have a protective or risk factor for prostate cancer. Those loci (DYS458, DYS393, DYS389II, DYS635, DYS385, DYS448, GATA172D05, DXS9902, DXS8378 e DXS10135) could be in linkage with genes that are important for cell cycle and cell growth. In conclusion, in this study various genes that could be important for prostate cancer development were identified.

Índice

Lista de Figuras.....	vii
Lista de quadros	viii
Abreviaturas.....	x
1 Introdução	12
1.1 Cancro da Próstata	12
1.1.1 Desenvolvimento do cancro da próstata	13
1.1.2 Alterações cromossómicas.....	14
1.1.3 Genética do cancro da próstata	16
1.2 Short Tandem Repeat (STR).....	19
1.2.1 STR na prática clínica.....	20
1.2.2 STR para a detecção de tumores.....	23
1.2.3 Outras aplicações dos STR	24
1.3 Cromossoma Y	24
1.3.1 Cromossoma Y no cancro da próstata	25
1.4 Cromossoma X	26
1.4.1 Cromossoma X no cancro da próstata	27
2 Objectivos	29
3 Material e Métodos	30
3.1 Amostras Biológicas	30
3.2 Extração de DNA	30
3.3 Amplificação.....	30
3.3.1 AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Yfiler $^{\text{TM}}$ (Applied Biosystems)	30
3.3.2 Argus X-8 (Mentype $^{\text{®}}$).....	31
3.3.3 Decaplex	32
3.4 Genotipagem.....	33
3.5 Sequenciação	34
3.5.1 Amplificação inicial de sequenciação.....	35
3.5.2 Purificação com MinElute $^{\text{®}}$ PCR Purification Kit (Qiagen)	36
3.5.3 Amplificação de sequenciação.....	36
3.5.4 Remoção dos terminadores com DyeEx 2.0 (Qiagen).....	37
3.6 Análise estatística	37

4	Resultados	38
4.1	Cromossoma Y	38
4.1.1	Região Yp11.2	39
4.1.2	Região Yq11.21	40
4.1.3	Região Yq11.221	42
4.1.4	Região Yq11.222	42
4.1.5	Região Yq11.223	44
4.1.6	Microvariações no <i>locus</i> DYS458	44
4.1.7	Descrição de um novo alelo para o <i>locus</i> DYS456.....	46
4.1.8	<i>Deleção</i> no <i>locus</i> DYS448.....	46
4.2	Cromossoma X	47
4.2.1	Argus X-8 (Mentype®).....	47
4.2.2	Decaplex - X	50
4.2.3	Sequenciação	51
5	Discussão	53
5.1	Cromossoma Y	54
5.2	Cromossoma X	57
6	Conclusões e Perspectivas Futuras	63
7	Referências Bibliográficas	65
	Anexo I – Protocolos laboratoriais	74
	Método modificado de extracção com fenol-clorofórmio	74
	Amplificação de DNA	75
	AmpF ℓ STR® Yfiler™ (Applied Biosystems)	75
	Argus X-8 (Mentype®).....	75
	Decaplex	76
	Sequenciação	77
	Amplificação inicial de sequenciação.....	77
	Purificação com MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen)	78
	Amplificação de sequenciação.....	79
	Remoção dos terminadores com DyeEx 2.0 (Qiagen).....	79
	Anexo II – Resultados.....	81
	Haplótipos de 16 Y-STR (AmpF ℓ STR® Yfiler™) de indivíduos com cancro da próstata.....	81
	Haplótipos de 8 X-STR (Argus X-8) de indivíduos com cancro da próstata	87

Haplótipos de 8 X-STR (Argus X-8) de indivíduos “normais”	90
Haplótipos de 10 X-STR (Decaplex X) de indivíduos com cancro da próstata	93
Haplótipos de 10 X-STR (Decaplex X) de indivíduos “normais”	97
Anexo III – Resultados da sequenciação	101
DYS456	101
DXS9902	102
DXS9898	102
DXS7132	104
Anexo IV – Poster 1	106
Anexo V – Poster 2	107
Anexo VI – Artigo 1	108
Anexo VII – Artigo 2	112

Lista de Figuras

Figura 1 - Localização cromossômica de <i>loci</i> de alta penetrância susceptíveis para o cancro da próstata descritos na literatura.	17
Figura 2 – Exemplos de uma inserção e de uma <i>deleção</i> em amostras com microvariações.....	45
Figura 3 – Electroforetograma do <i>ladder</i> alélico e da amostra 3609 para o <i>locus</i> DYS456.	46
Figura 4 – Localização cromossômica (em pb) dos <i>loci</i> do cromossoma Y em estudo e de genes que possam estar em desequilíbrio de <i>linkage</i> com eles.....	55
Figura 5 – Localização dos <i>loci</i> em estudo do cromossoma X e de genes que possam estar em desequilíbrio de <i>linkage</i> com eles.	58
Figura 6- Sequência da cadeia mais de DNA da amostra 3609	101
Figura 7 - Sequência da cadeia menos de DNA da amostra 3609.	101
Figura 8 - Sequência da cadeia mais de DNA de uma amostra com inserção de uma adenina antes do motivo de repetição (GATA) para o <i>locus</i> DXS9902.....	102
Figura 9 - Sequência da cadeia menos de DNA de uma amostra com inserção de uma timina antes do motivo de repetição (GATA) para o <i>locus</i> DXS9902.....	102
Figura 10 - Sequência da cadeia mais de DNA da amostra 3781 com um motivo de repetição incompleto para o <i>locus</i> DXS9898 e com a <i>deleção</i> de uma timina após este motivo	103
Figura 11 - Sequência da cadeia menos de DNA da amostra 3781 com um motivo de repetição incompleto para o <i>locus</i> DXS9898 e com a <i>deleção</i> de uma timina após este motivo	103
Figura 12 - Sequência da cadeia mais de DNA de uma amostra sem motivos de repetição incompletos para o <i>locus</i> DXS9898.....	104
Figura 13 - Sequência da cadeia menos de DNA de uma amostra sem motivos de repetição incompletos para o <i>locus</i> DXS9898.....	104
Figura 14 - Sequência da cadeia mais de DNA de uma amostra sem motivos de repetição incompletos para o <i>locus</i> DXS7132.....	105
Figura 15 - Sequência da cadeia menos de DNA de uma amostra sem motivos de repetição incompletos para o <i>locus</i> DXS7132.....	105

Lista de quadros

Quadro 1 - Cromossomas com alterações numéricas em pacientes com cancro da próstata em diversos estudos.	15
Quadro 2 - <i>Loci</i> de susceptibilidade para o cancro da próstata identificados por análise de <i>linkage</i>	18
Quadro 3 - <i>Loci</i> amplificados e fluorocromos utilizados no <i>kit</i> comercial AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Yfiler $^{\text{TM}}$ (Applied Biosystems).	31
Quadro 4 - <i>Loci</i> amplificados e fluorocromos utilizados no <i>kit</i> comercial Argus X-8 (Mentype $^{\text{®}}$).	31
Quadro 5 - <i>Loci</i> amplificados, fluorocromos e sequência nucleotídica dos <i>primers</i> do Decaplex.	32
Quadro 6 - Concentrações dos <i>primers</i> na reacção de PCR para o Decaplex.	33
Quadro 7 - Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados na sequenciação.	35
Quadro 8 - Temperaturas de <i>annealing</i> para a amplificação de cada <i>locus</i>	35
Quadro 9 - Localização cromossómica dos <i>loci</i> amplificados através do <i>kit</i> AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Y-Filer $^{\text{TM}}$ (Applied Biosystems).	38
Quadro 10 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata para os <i>loci</i> da região Yp11.2.	39
Quadro 11 - Frequências alélicas dos <i>loci</i> DYS393 e DYS458 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata.	40
Quadro 12 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata para os <i>loci</i> da região Yq11.21.	41
Quadro 13 - Frequências alélicas dos <i>loci</i> DYS389II e DYS635 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata.	42
Quadro 14 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata para os <i>loci</i> da região Yq11.221.	42
Quadro 15 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata para os <i>loci</i> da região Yq11.222.	43
Quadro 16 - Frequências alélicas dos <i>loci</i> DYS392 e DYS385 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata.	43
Quadro 17 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata para os <i>loci</i> da região Yq11.223.	44
Quadro 18 - Caracterização das microvariações encontradas nas amostras de indivíduos com cancro da próstata.	45
Quadro 19 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata dos <i>loci</i> DXS8378, HPRTB, DXS7423, DXS7132 e DXS10074 amplificados com o <i>kit</i> Argus X-8 (Mentype $^{\text{®}}$).	48
Quadro 20 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata dos <i>loci</i> DXS10134, DXS10101 e DXS10135 amplificados com o <i>kit</i> Argus X-8 (Mentype $^{\text{®}}$). .	49
Quadro 21 - Frequências alélicas dos <i>loci</i> DXS8378 e DXS10135 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata.	50

Quadro 22 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata dos <i>loci</i> DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA 172D05 e DXS9902 amplificados através do <i>multiplex</i> Decaplex-X.....	50
Quadro 23 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” e em indivíduos com cancro da próstata dos <i>loci</i> DXS7423, DXS7132, DXS6789 e DXS6809 amplificados através do <i>multiplex</i> Decaplex-X.....	51
Quadro 24 - Frequências alélicas dos <i>loci</i> GATA172D05, DXS9902 e DXS8378 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata.	51
Quadro 25 - Resultados da sequenciação para os <i>loci</i> DXS9902, DXS9898 e DXS7132.	52
Quadro 26 - Possíveis genes que possam estar em desequilíbrio de <i>linkage</i> com os Y-STR e X-STR analisados neste trabalho.	60

Abreviaturas

%	Porcentagem
μL	Microlitro
A	Adenina
AI	Desequilíbrio Alélico (<i>allelic imbalance</i>)
C	Citosina
CI	Intervalo de confiança
ddNTP	dideoxiribonucleótidos trifosfatados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotriol
EDNAP	<i>European DNA Profiling Group</i>
EDTA	Ácido etilenodinitrotetraacético
<i>et al</i>	e outros
FISH	Hibridação <i>in situ</i> com sonda fluorescente (<i>Fluorescent in situ hybridization</i>)
G	Guanina
g	Unidade de aceleração
GBY	<i>Gonadoblastoma on the Y chromosome</i>
GEP-ISFG	Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense
h	horas
HT	Hipertensão Arterial
IPO	Instituto Português de Oncologia
Kb	Kilo pares de bases
LOH	Perda de Heterozigotia (<i>loss of heterozygosity</i>)
Mb	milhões de pares de bases
min	minutos
mL	Mililitro
mtDNA	DNA mitocondrial
NAT	<i>Nucleosome assembly proteins</i>
ng	Nanogramas
°C	Grau Célsius

OD	<i>odds ratio</i>
p	Braço curto do cromossoma
pb	Pares de Bases
PCR	Reacção de polimerização em cadeia (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PSA	Antigénio específico da Próstata
q	Braço longo do cromossoma
RNA	Ácido Ribonucleico
s	segundos
SGBF	Serviço de Genética e Biologia Forense
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
STR	Short Tandem Repeat
T	Timina
U	Unidades
U.V.	Ultra Violeta
USP	Proteases específicas de Ubiquitina (<i>Ubiquitin specific proteases</i>)
UTR	<i>Untranslated Sequences</i>
v/v	Volume/Volume
VEGFD	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vs	<i>versus</i>
X-STR	STR do cromossoma X
Y-STR	STR do cromossoma Y

1 Introdução

1.1 Cancro da Próstata

O cancro da próstata é a patologia mais comum nos homens sendo a segunda causa de morte em países industrializados (Alers *et al.* 2000, Simard *et al.* 2003; Schulz *et al.* 2003). Os factores de risco incluem a idade avançada, a etnia e a existência de antecedentes familiares (Nwosu *et al.* 2001; Simard *et al.* 2003; Gillanders *et al.* 2004; Schaid, 2004). Um exemplo que demonstra o papel da etnia no risco de desenvolvimento do cancro da próstata foi a observação de que homens negros possuem uma taxa de incidência cerca de 10 vezes superior do que homens de outras etnias (Nwosu *et al.* 2001).

A incidência do cancro da próstata é muito variável sendo no entanto mais elevada nos Estados Unidos da América, no Canadá, na Suécia, na Austrália e em França. A maioria dos países Europeus apresenta incidências intermédias, enquanto os valores mais baixos são observados na população Asiática (Simard *et al.* 2003; Schaid, 2004). As diferenças observadas podem ser devidas a factores ambientais, como por exemplo, o tipo de alimentação. A dieta dos países Asiáticos em comparação com os Europeus ou Americanos é rica em factores protectores para o desenvolvimento desta patologia tais como: selénio, a.a. (folato e fitoesteronas) e antioxidantes (licopeno). Estudos epidemiológicos relativamente a hábitos alimentares revelaram que uma dieta rica em carnes vermelhas é um factor de risco (Schultz *et al.* 2003; Schaid, 2004). Para além de factores de risco relacionados com a alimentação foram descritos outros, tais como a exposição a químicos, as infecções sexualmente transmissíveis e a prostatite crónica (Rubin & De Marzo, 2004).

Em Portugal num estudo epidemiológico de diversos cancros na população portuguesa entre 1996-1998, ficou demonstrado que o risco de um homem desenvolver cancro da próstata é de 3,2% e de morrer desta patologia é de 3%. A percentagem de novos cancros da próstata entre 1988 e 1998 foi de 3,6%, ou seja, o número de indivíduos com este tipo de cancro aumentou ao longo dos 10 anos analisados (Pinheiro *et al.* 2003).

Hoje em dia, o rastreio do cancro da próstata passa pela determinação da concentração do antigénio específico da próstata (PSA), tendo este um papel fundamental na detecção precoce da patologia (Alers *et al.* 2000; Schultz *et al.* 2003;

Schaid, 2004). A detecção de níveis de PSA é muito sensível mas continua a ser um método imperfeito (Schultz *et al.* 2003), na medida em que muitos cancros da próstata continuam por detectar (Bradford *et al.* 2006).

Estima-se que 40% dos homens com mais de 50 anos tenham um cancro na próstata bem diferenciado e de crescimento lento, aumentando esta percentagem com a idade. A maioria dos cancros é assintomática, para além de serem pouco agressivos. Apenas 11% se tornam clinicamente visíveis e apenas 3% são causa de morte (Dong, 2006). Os autores de um estudo realizado na Holanda demonstraram que 25 a 50% dos homens com mais de 50 anos que não possuíam quaisquer evidências clínicas de cancro da próstata, apresentavam aquando da sua autópsia focos microscópicos de células cancerígenas que se encontram bem ou moderadamente diferenciadas (Alers *et al.* 2000).

A correlação entre as concentrações de PSA e a detecção do cancro da próstata diminuíram ao longo dos últimos anos, e a determinação do grau de agressividade (grau de Gleason) tem sido objecto de grande discussão e controvérsia. Deste modo, tem sido sugerido que a análise molecular das alterações cromossómicas que o tumor apresenta poderá ser uma ferramenta mais fiável para a previsão do desenvolvimento do cancro (Bradford *et al.* 2006; Dong, 2006)

1.1.1 Desenvolvimento do cancro da próstata

O cancro da próstata é uma doença multifactorial cujos componentes ambientais e genéticos estão envolvidos na etiologia. A doença é caracterizada por padrões de crescimento heterógenos que vão desde o crescimento lento do tumor até ao crescimento rápido de lesões metásticas (Nwosu *et al.* 2001).

Os avanços no conhecimento da genética molecular de cancros epiteliais sugerem que o processo de tumorigénese possa envolver a activação de oncogenes (para a proliferação celular), a perda de funcionalidade de genes supressores tumorais (para o controlo do ciclo celular) e/ou defeitos em genes reguladores de mecanismos de reparação de erros como, por exemplo, os genes de reparação de erros que ocorrem no DNA aquando da replicação (Alers *et al.* 2000; Porkka & Visakorpi, 2004; Burger *et al.* 2006; Dong, 2006).

As alterações genéticas podem afectar a função, o número, ou a dosagem genética (fazendo com que haja sobre- ou sub- expressão) (Dong, 2006). Estas alterações podem

ser hereditárias ou induzidas por carcinogéneos endógenos ou exógenos, sendo estes últimos característicos de cancros esporádicos (Dong, 2006).

Apesar do crescente número de estudos na área do cancro da próstata os seus mecanismos genéticos de desenvolvimento e progressão continuam por esclarecer. Uma vez que os factores que determinam o desenvolvimento desta patologia estão pouco esclarecidos é necessário que urgentemente se encontrem marcadores associados à doença (Sattler *et al.* 1999; Knobloch *et al.* 2004). Hoje em dia pensa-se que o risco para o desenvolvimento do cancro está dependente de factores ambientais e de factores genéticos, sendo esta interacção bastante complexa (Schaid, 2004).

Aproximadamente 9% de todos os cancros da próstata e 45% dos que ocorrem em homens com menos de 55 anos são devidos a um gene susceptível para a doença que é herdado de uma forma mendeliana como um alelo autossómico dominante (Riley & Krieger, 2001).

O modo de transmissão do cancro da próstata ainda não está bem esclarecido, uma vez que os estudos feitos apontam para várias direcções. Sendo assim, o cancro da próstata tanto pode ser transmitido através de um gene autossómico dominante como de um autossómico recessivo ou ainda através de um gene ligado ao cromossoma X (Rubin & De Marzo, 2004).

1.1.2 Alterações cromossómicas

A aplicação de métodos citogenéticos e moleculares permitiu a identificação de regiões dos cromossomas que estão associadas ao desenvolvimento do cancro da próstata (Knobloch *et al.* 2004)

Os carcinomas da próstata apresentam alterações cromossómicas que podem ser estruturais ou numéricas. A percentagem destas alterações é variável de estudo para estudo. König *et al.* (1996) reportaram 25% de alterações enquanto Sattler *et al.* (1999) apresentam um valor muito mais elevado (81%) (König *et al.* 1996; Sattler *et al.* 1999). De qualquer forma, é de notar que independentemente da frequência de alterações este fenómeno parece estar associado a esta mesma patologia. Quanto às alterações, estas tanto podem ser ganhos (inserções) como perdas (*deleções*) (König *et al.* 1996; Sattler *et al.* 1999).

König *et al.* (1996) demonstraram que no cancro da próstata, os ganhos cromossómicos são mais comuns que as perdas, tendo esta evidência sido confirmada posteriormente por Sattler *et al.* (1999). Porkka & Visakorpi observaram que as *deleções*

são encontradas em fases mais precoces do cancro da próstata enquanto as inserções (ganhos) são identificadas em tumores hormono-resistentes sugerindo, deste modo, que os oncogenes são activados num estado mais avançado da doença (Porkka & Visakorpi, 2004).

Konig *et al.* (1996) observaram que os ganhos mais frequentes reportam-se ao cromossoma 10 (65%), seguido do cromossoma 8 (44%), 1, 7 e 18 (estes últimos com ganhos entre os 35 e os 40%). Neste estudo, o cromossoma Y foi o que sofreu menos ganhos (16%) mas foi o que sofreu mais perdas (14%) (Konig *et al.* 1996).

Os cromossomas afectados nos vários estudos realizados variam de estudo para estudo e estão resumidos no quadro 1. No entanto, há a reter que determinados cromossomas são mais susceptíveis de sofrerem alterações do que outros, sugerindo assim a localização de proto-oncogenes que podem estar envolvidos no desenvolvimento da patologia. Gu *et al* (2004), estabeleceram uma linha celular de cancro da próstata de modo a poderem identificar e caracterizar os genes susceptíveis para esta doença (Gu *et al.* 2004). Esta linha celular apresentava alterações cromossómicas, nomeadamente, ao nível dos cromossomas Y, 1, 2, 3, 4, 8, 11, 14, 17 e 18, tal como foi observado em células tumorais de indivíduos com cancro da próstata (Gu *et al.* 2004).

Quadro 1 - Cromossomas com alterações numéricas em pacientes com cancro da próstata em diversos estudos.

Cromossoma	Estudo
1	Konig <i>et al.</i> 1996; Alers <i>et al.</i> 2000 ; Gu <i>et al.</i> 2004
2	Alers <i>et al.</i> 2000 ; Gu <i>et al.</i> 2004
3	Sattler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000 ; Gu <i>et al.</i> 2004
4	Sattler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000 ; Gu <i>et al.</i> 2004
5	Sattler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000
6	Sattler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000
7	Konig <i>et al.</i> 1996; Sattler <i>et al.</i> 1999; Erbersdobler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000
8	Konig <i>et al.</i> 1996; Sattler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000 ; Gu <i>et al.</i> 2004
9	Sattler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000
10	Konig <i>et al.</i> 1996; Erbersdobler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000
11	Gu <i>et al.</i> 2004
12	Sattler <i>et al.</i> 1999
13	Sattler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000
14	Gu <i>et al.</i> 2004
16	Konig <i>et al.</i> 1996; Alers <i>et al.</i> 2000
17	Erbersdobler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000 ; Gu <i>et al.</i> 2004
18	Alers <i>et al.</i> 2000 ; Gu <i>et al.</i> 2004
Y	Konig <i>et al.</i> 1996; Erbersdobler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000
X	Sattler <i>et al.</i> 1999; Erbersdobler <i>et al.</i> 1999; Alers <i>et al.</i> 2000

Para além das *deleções* e dos ganhos cromossómicos outras das alterações observadas nos cromossomas são a perda de heterozigotia (LOH – *loss of heterozygosity*) e o desequilíbrio alélico (AI - *allelic imbalance*). A LOH no cromossoma 8p é o achado mais consistente, sendo detectado em mais de metade dos casos observados. O mesmo fenómeno (LOH) é frequente na região cromossómica 13q (Schultz *et al.* 2003). Em 2004, Knobloch *et al.* estudaram 156 amostras de tumores com 24 *Short Tandem Repeat* (STR), preferencialmente com quatro nucleótidos, tendo verificado que as regiões cromossómicas que mais sofriam LOH e AI eram 13q e 8p, seguidas das 7q, 18q, 5q e 17p. Consoante o estado evolutivo do tumor as alterações afectavam diferentes regiões do cromossoma. Como eventos iniciadores destacaram as perdas das regiões 8p e 13q. Concluíram ainda que usando determinados marcadores é possível distinguir tumores mais agressivos de tumores menos agressivos (Knobloch *et al.* 2004).

Como foi possível observar, as alterações cromossómicas encontradas no cancro da próstata são variadas estando ainda por esclarecer os mecanismos que conduzem a esta instabilidade (Schultz *et al.* 2003).

1.1.3 Genética do cancro da próstata

Apesar dos estudos já realizados, a determinação genética para o cancro da próstata tem sido uma tarefa complexa (Xu *et al.* 1998). O número crescente de genes candidatos para o desenvolvimento do cancro da próstata deve-se ao rápido incremento de estudos de mapeamento do genoma humano. Os dados obtidos a partir dos estudos de *linkage* em famílias com a patologia sugerem que existam vários genes que conferem susceptibilidade e não apenas um, demonstrando que esta patologia é mais complexa do que se pensava inicialmente (Nwosu *et al.* 2001; Nupponen & Carpten, 2001; Simard *et al.* 2003). A predisposição genética para o cancro da próstata pode ser devida dois tipos de genes: genes de alta penetrância ou de baixa penetrância. Os primeiros podem ser distinguidos dos segundos uma vez que caso sofram mutações, o risco de desenvolvimento de cancro da próstata aumenta consideravelmente enquanto mutações nos de baixa penetrância apenas levam a um aumento moderado do risco de desenvolvimento da patologia. Estes últimos (baixa penetrância) estão associados a polimorfismos genéticos, nomeadamente SNP (*single nucleotide polymorphism*), e a sua prevalência na população é superior à de genes de alta penetrância (Porkka & Visakorpi,

2004). Na figura 1 é possível observar as localizações cromossômicas de *loci* de alta penetrância susceptíveis para o desenvolvimento do cancro da próstata hereditário.

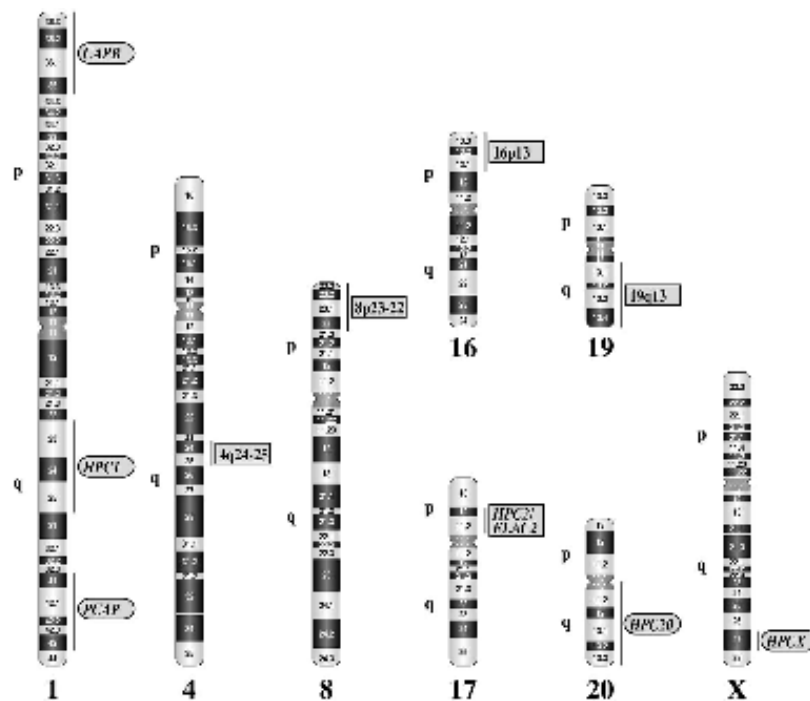


Figura 1 - Localização cromossômica de *loci* de alta penetrância susceptíveis para o cancro da próstata descritos na literatura. Os *loci* que se encontram dentro de rectângulos dizem respeito a *loci* descritos apenas uma vez, enquanto os outros dizem respeito a *loci* descritos duas ou mais vezes (adaptado de Simard *et al.* 2003).

Gillanders *et al.* explicaram que o elevado número de *loci* de predisposição para esta patologia advém do facto da maioria dos estudos ser realizada com um número baixo de famílias (pouco mais de 100), da heterogeneidade dos *loci* e das diferentes fenocópias¹ (doença causada por factores ambientais) da doença (Gillanders *et al.* 2004). Para estes autores, um modo de ultrapassar estes problemas é analisar os diversos dados já publicados de modo a aumentar a amostra populacional e a diminuir a heterogeneidade dos *loci* (Gillanders *et al.* 2004). Ao analisarem 426 famílias usando 406 STR, verificaram que a maior evidência de *linkage* com o cancro da próstata foi obtida na região 17q22 com o marcador D17S787. Para além desta região outras quatro apresentaram uma forte sugestão para *linkage*, nomeadamente 2q32, 15q11, Xq25 e 6q22, reduzindo o número de *loci* de 8 para apenas 4 (Gillanders *et al.* 2004).

¹ Fenótipo que mimetiza a expressão de um genótipo devido a factores ambientais (Regateiro, 2007a)

Para além dos *loci* identificados, estão descritos três genes candidatos: *ELAC2* (cromossoma 17p11 na região HPC2), *RNASEL* (na região HPC1) e *MSR1* (na região 8p) (Simard *et al.* 2003; Porkka & Visakorpi, 2004). No entanto, estes genes, caso seja confirmada a sua susceptibilidade, representam apenas uma pequena fracção dos que já se observaram e descreveram para o cancro da próstata (Gillanders *et al.* 2004). No quadro 2 é possível observar as regiões e localizações de possíveis genes de susceptibilidade para o cancro da próstata identificados até 2004 utilizando estudos de *linkage*.

Quadro 2 - *Loci* de susceptibilidade para o cancro da próstata identificados por análise de *linkage*. AD (autossómico dominante); AR (autossómico recessivo) (adaptado de Rubin & De Marzo, 2004).

<i>Loci</i> de susceptibilidade	<i>Locus</i>	Modo de transmissão	Possível gene
HPC1	1q24-25	AD	<i>RNASEL</i>
PCAP	1q42.2-43	AD	?
CAPB	1p36	AD	?
HPCX	Xq27-28	Ligado ao X/AR	?
HPC20	20q13	AD	?
HPC2	17p	AD	<i>HPC2/ELAC2</i>
	8p22-23	AD	<i>MSR1</i>

O estudo de genes de baixa penetrância é feito através da realização de estudos de associação. Estes, fazem uma abordagem indirecta na medida em que se compara a incidência de um determinado polimorfismo na população de indivíduos afectados com a incidência desse mesmo polimorfismo na população de indivíduos controlo (Nupponen & Carpten, 2001; Regateiro, 2007b). Deste modo, foram já realizados estudos em polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo endócrino tais como o gene da leptina (*LEP*) (Ribeiro *et al.* 2004), o gene do antigénio específico da próstata (*PSA*) (Medeiros *et al.* 2002a), o gene do receptor do androgénio (gene *AR*) ou do receptor do estrogénio (gene *ER*) (Medeiros *et al.* 2003). Os polimorfismos dos genes que se localizam perto do gene do receptor do androgénio também já foram estudados (Riley *et al.* 1999). Para além de polimorfismos de genes envolvidos nos mecanismos endócrinos, foram também estudados genes de vias de destoxificação, tais como os genes *GST* (Medeiros *et al.* 2004) e *NAT* (Costa *et al.* 2004). O polimorfismo do gene do receptor da vitamina D também foi investigado na medida em que a ingestão desta vitamina diminui o risco de cancro da próstata uma vez que é inibidora da proliferação celular (Medeiros *et al.* 2002b).

Para além do DNA cromossómico, o mtDNA (DNA mitocondrial) parece estar também envolvido no desenvolvimento desta patologia. Foram já observadas alterações

na sequência desta molécula em neoplasias prostáticas intraepiteliais, consideradas precursoras do cancro da próstata. As mutações mais observadas são as que se encontram nos genes da citocromo oxidase (*COI*), juntamente com as que ocorrem em genes que inibam a fosforilação oxidativa. Estas alterações levam a um aumento de espécies reactivas de oxigénio (Petros *et al.* 2005).

Apesar dos inúmeros estudos de tentativas de localização de genes de susceptibilidade para o cancro da próstata ainda não foi possível chegar a um consenso, sendo que estes estudos trazem alguma esperança mas também muita indefinição. Várias teorias podem explicar este facto: uma vez que existem cerca de 30000 genes apenas uma mínima percentagem destes é que foram estudados; as mutações ou alterações podem localizar-se fora de regiões codificantes e estas podem alterar a função de um ou mais genes; por último, o DNA pode sofrer outras alterações que afectem os oncogenes ou os genes supressores de tumores que não as mutações como por exemplo as hiper ou hipometilações (Porkka & Visakorpi, 2004). Para além destes factores, o processo neoplásico do cancro da próstata pode ser devido à interacção de vários genes e/ou destes com factores ambientais (Rubin & De Marzo, 2004; Schaid, 2004).

Também já foram identificados *locus* de susceptibilidade para o cancro da próstata em que não foi possível encontrar qualquer gene nessa mesma zona. Um exemplo é a região 7q31 que se encontra *deletada* no cancro da próstata não tendo ainda sido identificado nesta zona nenhum gene que possa estar envolvido no desenvolvimento desta patologia (Dong, 2006).

1.2 Short Tandem Repeat (STR)

O DNA dos organismos eucarióticos é caracterizado por possuir sequências repetitivas ao longo do seu genoma. No genoma humano, estas sequências representam 40% do DNA total, exibindo vários tipos de motivos de repetição (desde apenas uma até várias bases) e ocorrem tanto nas regiões codificantes como nas não codificantes. Na maioria dos casos estão organizadas em repetições de 2 a 6 nucleótidos – os STR, sendo que cada unidade pode ser repetida de 5 a 30 vezes (Tamaki & Jeffreys, 2005). Os STR cobrem cerca de 3% do genoma humano e são altamente polimórficos, encontrando-se dispersos por todo o genoma humano (Tamaki & Jeffreys, 2005), ocorrendo em cada 10000 pares de bases (pb) (Ellegren, 2004). Os mais comuns são as repetições

dinucleotídicas (de apenas 2 nucleótidos) de AC e AT (Astolfi *et al.* 2003), seguidas das mono, tetra e trinucleotídicas (Ellegren, 2004). Os STR localizam-se na sua maioria nas regiões não codificantes do genoma, podendo estar em regiões intergênicas ou em intrões (Ellegren, 2004).

As repetições trinucleotídicas têm um papel interessante na medida em que sofrem expansões. As sequências aumentadas podem sofrer novamente um acréscimo causando instabilidade. Se o foco de instabilidade se encontrar perto de genes ou nas suas regiões flangeadoras a expressão e função genética pode ficar comprometida. Esta característica é mais frequente em repetições de 3 nucleótidos ocorrendo também em repetições de 4 (CCTG, TCAT), 5 (ATTCT) e 12 nucleótidos (Astolfi *et al.* 2003).

Os STR, também denominados de microsátélites, foram descobertos no início dos anos 80 e são as unidades mais variáveis que se encontram no genoma humano (Ellegren, 2004). Os seus polimorfismos variam em tamanho podendo também variar na sequência primária (Ellegren, 2004). Foram descobertos em 1984 através da utilização de sondas multi-*locus* (Tamaki & Jeffreys, 2005).

No âmbito forense, os STR utilizados localizam-se nas regiões intergênicas ou em intrões (Ellegren, 2004). Foram descritos como uma ferramenta útil para a identificação individual no início dos anos 90, uma vez que o número de repetições de cada STR varia de indivíduo para indivíduo (Butler, 2006). Das inúmeras vantagens destes sistemas há a realçar o tamanho pequeno dos seus alelos (entre 100 e 400pb), sendo esta uma característica útil quando se está na presença de DNA degradado. Quando comparados com outros marcadores, os STR são preferíveis porque: os alelos de cada *locus* permitem a amplificação *multiplex* (mais do que um locus a ser amplificado ao mesmo tempo); geram produtos de PCR (*polymerase chain reaction*) pequenos facilitando a recolha de informação mesmo quando se está na presença de amostras degradadas; entre outras características.

1.2.1 STR na prática clínica

Os STR são usados preferencialmente no âmbito da genética forense. No entanto, a análise de STR é usada para o mapeamento de doenças genéticas, para estudos populacionais e para estudos da instabilidade genética de tumores (Vauhkonen *et al.* 2004). A vantagem dos STR é que permitem a realização de um *screening* do genoma humano de modo a localizarem-se regiões que possuam determinadas características nos indivíduos afectados (Schaid, 2004).

Na prática clínica os STR são usados para o mapeamento de doenças genéticas. Vários laboratórios realizam estudos de frequências alélicas de STR estabelecendo a sua comparação entre indivíduos “normais” e doentes, de modo a auxiliar o estudo de doenças, tendo sido já utilizados cerca de 400 STR, de modo a abranger todo o genoma humano. Caso seja encontrada uma associação entre um marcador STR e uma determinada doença, através da análise de *linkage*, a localização exacta do marcador vai auxiliar o investigador a detectar o gene que poderá estar envolvido na doença (Butler, 2005). Vários STR já foram descritos como sendo úteis para a localização de várias doenças com causa genética através de LOH ou AI (Butler, 2006).

Em 1995, o *European DNA Profiling Group* (EDNAP) aquando de um estudo colaborativo constatou que alguns países se recusavam a usar determinados STR – os que se encontravam ligados a doenças. Estes STR podem ser divididos em dois grupos distintos, sendo o mais problemático o grupo em que se encontram os STR que estão directamente relacionados com uma doença (como é o caso da doença de Huntington ou a síndrome do X frágil) ou os que possuem determinados alelos que estão directamente associados com uma doença numa determinada população (Kimpton *et al.* 1995).

Assim sendo, o grupo EDNAP afirma que a grande maioria dos STR, se não mesmo todos, serão importantes para o mapeamento de doenças genéticas e o seu uso na prática clínica deverá ser reconhecido como uma outra das suas vantagens (Kimpton *et al.* 1995; Butler, 2006).

Um exemplo directo da aplicação de STR é a identificação de trissomias tais como a síndrome de Down (no cromossoma 21) ou a síndrome de Edwards (no cromossoma 18) usando apenas uma reacção de PCR. A vantagem dos sistemas PCR *multiplex* para a detecção de doenças (neste caso trissomias) é a redução do tempo e do número de células necessárias para o diagnóstico pré-natal (Yoon *et al.* 2002). A trissomia 21, vulgarmente conhecida como síndrome de Down pode ser detectada através da observação de 3 alelos em qualquer marcador que se localize no cromossoma 21. O mesmo se pode dizer de qualquer marcador que se situe no cromossoma 18 para a trissomia 18 (síndrome de Edwards) (Butler, 2006). Usando vários marcadores do cromossoma 8, foi mapeado na região 8q24 o *locus* para o síndrome de Meckel-Gruber havendo *linkage* com o marcador D8S1179 (Morgan *et al.* 2002).

Num outro estudo em que foram utilizados 401 STR os autores demonstraram que o marcador D8S1179 era o que estava mais próximo do gene responsável pela

microalbuminina urinária (afecta a função renal e causa problemas cardiovasculares) (Butler, 2006).

Riley & Krieger (2005) estudaram STR homólogos próximos de genes candidatos para o desenvolvimento do cancro da próstata e descobriram que os STR têm um papel funcional na medida em que se encontram sobre pressão selectiva (Riley & Krieger, 2005). Para estes autores, alguns STR possuem funções somáticas uma vez que estão implicados cancros hereditários ou esporádicos (Riley & Krieger, 2005).

Para além das alterações genéticas, podem ocorrer expansões nos STR estando estas associadas a patologias incluindo cancro. As expansões tanto ocorrem em regiões codificantes (doença de Huntington) como em regiões não codificantes (algumas formas de X frágil) (Boby *et al.* 2005).

O único marcador forense que até à data caiu em desuso por estar ligado a doenças é o HumARA (Butler, 2006). Este marcador situa-se na região codificante, mais propriamente no exão 1, do receptor do androgéneo no cromossoma X. A realização de vários estudos permitiu verificar que existia uma associação entre este marcador e a atrofia muscular espinhobulbar (doença de Kennedy) entre outras patologias (Szibor *et al.* 2005).

Um marcador controverso, uma vez que se supunha que estivesse em *linkage* com várias doenças de ordem genética, tem sido TH01, que se localiza no primeiro intrão do gene da tirosina hidroxilase (*TH*). Foram descritas associações de determinados alelos com a doença esquizofrénica ou com a doença bipolar (Butler, 2006). O TH01 localiza-se no primeiro intrão do gene da tirosina hidroxilase (*TH*). Num estudo de caso-controlo cujo objectivo era investigar se um determinado alelo tinha efeito na esquizofrenia, os autores demonstraram que um alelo raro (alelo 10) aparecia no grupo dos casos não estando presente no grupo dos controlos. Os autores sugeriram que os polimorfismos existentes neste intrão podem afectar o *splicing* alternativo do gene *TH* causando diferenças na expressão das proteínas noradrenérgicas ou mesmo diferenças na sua actividade (Thibaut *et al.* 1997). Estes mesmos resultados foram observados numa população Polaca (Jacewicz *et al.* 2006). Para além destes estudos, parece que o marcador TH01 está associado à hipertensão arterial (HT) (Sharma *et al.* 1998). Tal como no caso da esquizofrenia determinados alelos estão mais representados no grupo de indivíduos com HT do que no grupo de indivíduos normotensos (Sharma *et al.* 1998). No entanto, estudos posteriores não permitiram confirmar esta associação (Butler, 2006).

Alguns alelos de outros STR, nomeadamente do D5S818, estão relacionados com a susceptibilidade para o *Plasmodium falciparum*, conferindo aos seus portadores maior susceptibilidade para o desenvolvimento de malária, uma vez que estes marcadores se localizam perto de genes implicados na resistência a esta doença (Gaikwad *et al.* 2005).

Através dos vários exemplos anteriores, está mais que claro que os STR possuem funções genéticas específicas que podem modular uma variedade de patologias (Jacewicz *et al.* 2006).

1.2.2 STR para a detecção de tumores

Os tecidos neoplásicos apresentam uma série de alterações genéticas tais como instabilidade cromossómica, *deleções* alélicas (perda de heterozigotia – LOH) e inserções alélicas, devido à instabilidade de microsatélites (Vauhkonen *et al.* 2004). Quando esta última ocorre, surgem novos alelos devido a erros durante a replicação do DNA (Vauhkonen *et al.* 2004). Estas alterações foram descritas em tumores gastrointestinais (Vauhkonen *et al.* 2004).

Para o cancro dos ovários, Buekers *et al.* (2000) usaram vários X-STR (STR que se localizam no cromossoma X) para fazerem o mapeamento genético da patologia. Os autores observaram que as perdas de heterozigotia eram mais elevadas na região do marcador DXS6807, indicando que nesta região cromossómica poderá estar um gene associado à carcinogénese (Buekers *et al.* 2000).

Para se elucidarem os mecanismos de interacção ambiente-gene durante o processo de carcinogénese e a susceptibilidade de cada indivíduo para o cancro da próstata são estudados dois tipos de polimorfismos: os SNP e os STR. Um dos STR mais investigado no cancro da próstata é a repetição CAG que se encontra no primeiro exão do gene do receptor de androgénico (gene *AR*) (Santos *et al.* 2003; Tran *et al.* 2004). Os dados quanto a este polimorfismo são contraditórios na medida em que em alguns estudos existe correlação entre o número de repetições e o risco de desenvolvimento do cancro da próstata (Mishra *et al.* 2005) enquanto noutros não existe qualquer relação. O mecanismo pelo qual o número de repetições possa ser factor de risco para o cancro prende-se com a actividade da transcrição do gene (Tran *et al.* 2004). Um dos factores que pode explicar as diferenças observadas nos estudos publicados prende-se com a origem geográfica da população estudada (Santos *et al.* 2003) e de outros factores inerentes à própria população tais como a idade e não com os diferentes métodos de determinação do número de repetições (Tran *et al.* 2004). Apesar da relação do número

de repetições CAG do gene *AR* não estar bem esclarecida na patologia do cancro da próstata, já se encontra descrita uma relação com a doença de Kennedy (Santos *et al.* 2003).

1.2.3 Outras aplicações dos STR

Os STR para além de serem as ferramentas de análise na área da genética forense também podem ser utilizados com outros propósitos como por exemplo na elaboração de estudos populacionais, caracterização de linhas celulares, monitorização de transplantes de medula ou transfusões sanguíneas, detecção de quimeras (presença de duas linhas celulares distintas no mesmo organismo) ou mesmo para a monitorização de partilha de seringas (Butler, 2005).

1.3 Cromossoma Y

Desde a sua descoberta em 1921 que a comunidade científica tem opiniões divergentes acerca do seu papel. Devido ao enorme número de STR que possui, o cromossoma Y foi considerado durante muito tempo como “lixo genético” sendo apenas necessário para a determinação sexual (Krausz *et al.* 2004). Esta ideia foi completamente abalada aquando da descoberta de genes no cromossoma Y e de um sistema de correcção aquando da replicação deste cromossoma (Krausz *et al.* 2004).

O cromossoma Y possui 33 genes funcionais que se dividem em três grupos distintos.

- Regiões pseudoautossómicas – neste grupo encontram-se genes que são homólogos aos do cromossoma X e que são responsáveis pelo correcto emparelhamento entre os dois cromossomas durante a meiose. As duas regiões pseudoautossómicas são designadas PAR1 e PAR2. A região PAR1 localiza-se no telómero do braço curto do cromossoma e possui cerca de 2.6 milhões de pares de bases (Mb) de DNA, contendo 10 genes que desempenham papéis fundamentais em várias funções celulares, nomeadamente no crescimento ósseo, sinalização por citocinas, metabolismo celular, síntese da melatonina e expressão de antigénios de superfície. A região PAR2 é oposta à PAR1, situando-se no telómero do braço longo do cromossoma, possuindo apenas 400Kb de DNA e comporta dois genes. A cada gene destas duas regiões (PAR1 e PAR2) corresponde um idêntico nas regiões PAR do cromossoma X, sendo estes

importantes para o correcto emparelhamento (Lau, 1999; Lau & Zhang, 2000; Dasari *et al.* 2001; Krausz *et al.* 2004).

- Genes idênticos e não homólogos aos do cromossoma X – neste grupo encontram-se genes que se localizam na região não recombinante do cromossoma Y, contendo 10 genes de cópia única sendo a maioria expressos em todos os tecidos humanos. A função dos genes ainda está por esclarecer (Lau, 1999; Lau & Zhang, 2000; Dasari *et al.* 2001).

- Genes específicos do cromossoma Y – esta é uma região não recombinante, contendo 11 genes. Com a excepção da região para a determinação do sexo (SRY), todos os genes encontram-se repetidos ao longo do cromossoma. As funções da grande maioria destes genes continuam por esclarecer (Lau, 1999; Lau & Zhang, 2000; Dasari *et al.* 2001; Krausz *et al.* 2004).

Um modo indirecto de tirar ilações sobre o papel dos genes do cromossoma Y numa determinada doença é estudarem-se haplogrupos de indivíduos doentes e compará-los com indivíduos “normais” (Krausz *et al.* 2004).

1.3.1 Cromossoma Y no cancro da próstata

O cancro da próstata é um processo mediado por vários componentes ambientais e genéticos. Um ou mais componentes genéticos podem provir do cromossoma Y uma vez que possui uma série de genes que desempenham um papel essencial e crítico na determinação, diferenciação e manutenção de tecidos específicos do homem tal como a próstata (Lau & Zhang, 2000).

Uma observação que pode evidenciar o papel do cromossoma Y no desenvolvimento desta patologia é que indivíduos relacionados em primeiro grau (ex: pai, filho ou irmão) com um indivíduo que possui este tipo de cancro têm maiores probabilidades de desenvolverem a doença do que aqueles que não possuem um parente em primeiro grau afectado (Lau & Zhang, 2000).

O papel do cromossoma Y no cancro tem sido bastante controverso. As alterações cromossómicas mais frequentes aquando do desenvolvimento da doença são as *deleções* (Perinchery *et al.* 2000; Paracchini *et al.* 2003). As *deleções* na região Yp são mais frequentes ocorrendo em cerca de 35% dos tumores sugerindo que esta perda possa estar associada ao desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (Jordan *et al.* 2001).

Dos 33 genes existentes neste cromossoma alguns são supressores de tumores e outros oncogenes (Lau, 1999; Krausz *et al.* 2004). Estes dois tipos de genes poderão

actuar durante as diferentes fases da tumorigénese, nomeadamente em cancros de órgãos específicos do homem como por exemplo a próstata (Lau, 1999). Lau & Zhang (2000) estudaram a expressão de 31 genes deste cromossoma no cancro da próstata tendo verificado que alguns deles se encontravam sobre- ou sub-expressos (Lau & Zhang, 2000). Outros autores fizeram o mesmo estudo de expressão de genes do cromossoma Y no cancro da próstata tendo chegado à conclusão que os genes presentes neste cromossoma poderão ter um papel nesta patologia (Dasari *et al.* 2001). Posteriormente num outro estudo, os autores identificaram vários genes do cromossoma Y que são expressos diferencialmente quer se trate de células cancerosas ou células normais (Lau *et al.* 2003).

Uma outra evidência demonstrativa da importância deste cromossoma no desenvolvimento do cancro da próstata foi a observação de que aquando da introdução deste cromossoma numa linha celular neoplásica da próstata o crescimento tumoral cessava. Esta observação apoia a hipótese de que exista neste cromossoma um gene supressor de tumores que está envolvido no desenvolvimento do cancro da próstata (Vijayakumar *et al.* 2005). Posteriormente foi verificado que a região responsável pela cessação do crescimento tumoral era a Yp11.2 (Vijayamukamar *et al.* 2006).

Em 2002, usando o marcador DYS19 foi demonstrado que diferentes linhagens do cromossoma Y conferem susceptibilidade ou resistência para o cancro da próstata em doentes Japoneses (Ewis *et al.* 2002).

Num estudo realizado por Parachini *et al.* (2003) em que se analisaram diferentes haplogrupos do cromossoma Y, os autores verificaram que uma determinada linhagem (haplogrupo) de indivíduos Japoneses tem maior predisposição para o cancro do que outras (Parachini *et al.* 2003).

1.4 Cromossoma X

O cromossoma X é uma molécula de DNA linear com aproximadamente 155Mb (Spatz *et al.* 2004; Ross *et al.* 2005), constituindo cerca de 5% do genoma humano haplóide (Graves *et al.* 2002; Schaffner, 2004). Apenas 3% da sua sequência são genes ocupando por isso a 17^a posição dos 24 cromossomas em termos de densidade genética (Graves *et al.* 2002; Schafnner, 2004). Estima-se que tenha cerca de 1098 genes, sendo também rico em sequências repetitivas, entre as quais *interspersed repeats* (~56% da

sequência eucromática), como por exemplo sequências *Alu*, duplicação de segmentos (~2,6% do cromossoma X), e extensas regiões de DNA satélite (Ross *et al.* 2005). Este cromossoma possui características que são únicas no genoma humano. As mulheres herdam um cromossoma X de cada um dos progenitores enquanto os homens apenas herdam o cromossoma X da sua mãe (Ross *et al.* 2005). Ambos os cromossomas sexuais evoluíram a partir de um par de autossomas há cerca de 300 milhões de anos (Schafnner, 2004). No entanto, o cromossoma Y perdeu grande parte da sua sequência nucleotídica e consequentemente genes tendo desenvolvido um padrão único de sequências repetidas. Por outro lado, o cromossoma X manteve quase intacta a sua sequência nucleotídica sendo semelhante a um autossoma (Schafnner, 2004). Os cromossomas sexuais (X e Y) possuem regiões homólogas nas suas extremidades entre as quais existe recombinação – as regiões pseudoautossómicas (PAR1 e PAR2) (Schafnner, 2004).

1.4.1 Cromossoma X no cancro da próstata

Os resultados de vários estudos em indivíduos com cancro da próstata sugerem a localização de um *locus* no cromossoma X que confere susceptibilidade à doença. Na realidade, ficou demonstrado que indivíduos que têm um irmão com a doença apresentam um maior risco de a desenvolver, quando comparados com indivíduos que tenham um pai com a doença, sendo esta observação é consistente com a hipótese de transmissão hereditária de um gene ligado ao cromossoma X (Monroe *et al.* 1995). Xu *et al.* estudaram a região Xq27-28 numa população de 360 famílias de várias regiões (América do Norte, Finlândia e Suécia) com cancro da próstata hereditário e observaram que existia uma correlação entre a doença e vários marcadores STR. Ficou assim demonstrada a existência de um *locus* que confere susceptibilidade para o cancro da próstata passando este a ser denominado *HPCX* (Xu *et al.* 1998). Uma vez que existem evidências para a localização de um gene susceptível para o cancro da próstata na região Xq25-27, Stephan *et al.* (2002) construíram um clone desta mesma região podendo assim estudar a expressão genética de potenciais genes para o cancro da próstata (Stephan *et al.* 2002).

No cromossoma X, próximo do gene *AR*, localiza-se o gene *PGKI* (gene da fosfoglicerato cinase). Esta região, Xq11-13, é caracterizada por possuir vários genes relacionado com alterações urológicas tais como predisposição familiar para o cancro da próstata e insensibilidade ao androgéneo. O gene *PGKI* possui um STR na região 3',

tendo um elevado grau de polimorfismo. Sendo assim, este STR foi estudado numa população Japonesa tendo ficado demonstrado que os seus alelos podem ser marcadores genéticos para a determinação de neoplasias e do cancro da próstata (Tie *et al.* 2006).

Para além dos STR deste gene, foram já estudados o número de repetições CAG que se encontram no gene *AR* (receptor do androgénico). Este gene localiza-se, tal como o anterior, no cromossoma X mais propriamente na região Xq11-12. É constituído por 8 exões, sendo que o primeiro exão é constituído por dois motivos de repetição diferentes (CAG e GGN) (Rajender *et al.* 2007). Os autores de vários estudos realizados em indivíduos Americanos de diferentes etnias demonstraram a existência de associação entre o número de repetições CAG e o risco de desenvolvimento de cancro da próstata. No entanto, outros autores realizaram estudos em indivíduos Americanos ou em indivíduos Asiáticos refutando esta mesma associação (Rajender *et al.* 2007). As mesmas conclusões podem ser tiradas para o outro motivo de repetição (GGN). Os autores de alguns estudos demonstraram a existência de associação entre o número destas repetições e o risco de desenvolvimento de cancro da próstata e outros não (Rajender *et al.* 2007). Apesar destas diferenças há que ter em conta que o risco de cancro da próstata pode ser dependente da população utilizada no estudo bem como de diferentes factores ambientais e dietéticos a que estão sujeitas estas populações (Medeiros *et al.* 2004).

2 Objectivos

Tal como foi referido na introdução a identificação de um ou mais genes implicados no cancro da próstata tem sido uma tarefa árdua. Um modo de se identificarem genes é fazer-se o *screening* do genoma humano, recorrendo ao uso de STR.

Os genes que se localizam nos cromossomas sexuais (cromossoma X e Y) parecem desempenhar um papel no desenvolvimento do cancro da próstata. No que diz respeito ao cromossoma X, há a reter que alguns estudos apontam para um modo de transmissão ligado a este cromossoma e que alguns genes estão envolvidos no desenvolvimento da patologia. Quanto ao cromossoma Y, está *deletado* em muitos dos cancros analisados sugerindo a localização de genes supressores de tumores nestas regiões. Para além disso, o cromossoma Y é responsável pela diferenciação de alguns tecidos específicos do homem tal como a próstata.

Deste modo, os objectivos deste trabalho foram os seguintes:

- Determinar a existência de relação entre os resultados da caracterização de marcadores do cromossoma Y de uso forense e a etiologia do cancro da próstata;
- Determinar a existência de relação entre os resultados da caracterização de marcadores do cromossoma X de uso forense e a etiologia do cancro da próstata.

3 Material e Métodos

3.1 Amostras Biológicas

- Amostra populacional de 282 indivíduos do sexo masculino diagnosticados com cancro da próstata no Instituto Português de Oncologia (IPO) do Porto. Os indivíduos apresentavam diferentes estádios da evolução da doença. Todas as amostras foram obtidas com o consentimento informado dos indivíduos anteriormente referidos, de acordo com a Declaração de Helsínquia.

- Amostra populacional de 315 indivíduos aparentemente saudáveis que se apresentaram no Serviço de Genética e Biologia Forense (SGBF) da Delegação Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. para serem submetidos a investigação de parentesco biológico.

Todas as amostras foram sujeitas a uma codificação para que estivesse garantida a confidencialidade relativamente à identidade dos indivíduos analisados neste estudo.

3.2 Extracção de DNA

O DNA isolado de sangue periférico de indivíduos com cancro da próstata foi obtido através de um processo de *salting out* a partir dos glóbulos brancos (Miller *et al.* 1988) e havia sido isolado previamente no Laboratório de Oncologia Molecular do IPO-Porto.

O DNA de indivíduos aparentemente saudáveis foi extraído de uma zaragatoa bucal recorrendo-se ao método modificado de extracção com fenol-clorofórmio (Maniatis *et al.* 1982) (Anexo I).

3.3 Amplificação

3.3.1 AmpF ℓ STR[®] Yfiler[™] (Applied Biosystems)

Este *kit* comercial permite a amplificação de 17 STR do cromossoma Y numa única reacção de PCR. Os *loci* amplificados e os seus fluorocromos encontram-se descritos no quadro 3.

Quadro 3 - *Loci* amplificados e fluorocromos utilizados no *kit* comercial AmpF ℓ STR® Yfiler™ (Applied Biosystems).

<i>Locus</i>	Fluorocromo
DYS456	6-FAM
DYS389I	6-FAM
DYS390	6-FAM
DYS389II	6-FAM
DYS458	VIC
DYS19	VIC
DYS385 a/b	VIC
DYS393	NED
DYS391	NED
DYS439	NED
DYS635	NED
DYS392	NED
Y GATA H4	PET
DYS437	PET
DYS438	PET
DYS448	PET

O DNA foi amplificado num volume de reacção de 12,5 μ L, contendo 4,6 μ L de Reaction Mix, 2,5 μ L de Primer Set, 0,5U de Taq DNA polymerase e 1 μ L de DNA, sendo as condições de PCR as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 11min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1min, *annealing* dos *primers* a 61°C durante 1min, extensão a 72°C durante 1min. A extensão final ocorreu a 60°C durante 80min (Anexo I).

3.3.2 Argus X-8 (Mentype®)

Este *kit* comercial permite a amplificação de 8 *loci* do cromossoma X numa única reacção de amplificação e o *locus* da amelogénina. Os *loci* amplificados e os seus fluorocromos encontram-se descritos no quadro 4.

Quadro 4 - *Loci* amplificados e fluorocromos utilizados no *kit* comercial Argus X-8 (Mentype®).

<i>Locus</i>	Fluorocromo
Amelogénina	6-FAM
DXS101034	6-FAM
DXS7132	6-FAM
DXS7423	6-FAM
DXS8378	6-FAM
HPRTB	6-FAM
DXS10074	HEX
DXS10101	HEX
DXS101035	HEX

O DNA foi amplificado num volume de reacção de 12,5µL, contendo 2,5µL de Reaction Mix B, 1,25µL de Primer Pair Mix, 0,5U de Taq DNA polymerase e 1µL de DNA, sendo as condições de PCR as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 4min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, *annealing* dos *primers* a 58°C durante 120s, extensão a 72°C durante 75s. A extensão final ocorreu a 68°C durante 60min (Anexo I).

3.3.3 Decaplex

Neste *multiplex*, desenhado pelo Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense (GEP-ISFG), são amplificados numa única reacção 10 *loci* do cromossoma X. Os *loci* amplificados, seus fluorocromos e sequência nucleotídica dos *primers* encontram-se descritos no quadro 5.

Quadro 5 - *Loci* amplificados, fluorocromos e sequência nucleotídica dos *primers* do Decaplex. F – primer forward; R – primer reverse.

<i>Locus</i>	Fluorocromo		Sequência nucleotídica (5'-3')
DXS8378	6-FAM	F	TTAGGCAACCCGGTGGTCC
		R	ACAAGAACGAACTCCAATC
DXS9898	6-FAM	F	CGAGCACACCTACAAAAGCTG
		R	TAGGCTCACCTCACTGAGCA
DXS7133	6-FAM	F	CACTTCCAAAAGGGGAAAAA
		R	ACTTGTACTTGGTGGGAGGAA
GATA31E08	6-FAM	F	GCAAGGGGAGAAGGCTAGAA
		R	TCAGCTGACAGAGCACAGAGA
GATA172D05	VIC	F	TAGTGGTGATGGTTGCACAG
		R	ATAATTGAAAGCCCGGATTC
DXS7423	VIC	F	GTCTTCCTGTCATCTCCCAAC
		R	TAGCTTAGCGCCTGGCACATA
DXS6809	VIC	F	TCCATCTTTCTCTGAACCTTCC
		R	TGCTTTAGGCTGATGTGAGG
DXS7132	NED	F	TCCCTCTCATCTATCTGACTG
		R	CACTCCTGGTGCCAACTCT
DXS9902	NED	F	CTGGGTGAAGAGAAGCAGGA
		R	GGCAATACACATTCATATCAGGA
DXS6789	NED	F	CTTCATTATGTGCTGGGGTAAA
		R	ACCTCGTGATCATGTAAGTTGG

Apesar do procedimento experimental já se encontrar descrito pelo GEP-ISFG, foi necessário proceder à optimização da concentração de *primers* na reacção de amplificação tendo-se chegado às seguintes concentrações (quadro 6).

Quadro 6 - Concentrações dos *primers* na reacção de PCR para o Decaplex.

<i>Locus</i>	Concentração μM
DXS8378	0,4
DXS9898	0,3
DXS7133	0,3
GATA31E08	0,1
GATA172D05	0,1
DXS7423	0,1
DXS6809	0,1
DXS7132	0,1
DXS9902	0,1
DXS6789	0,1

O DNA foi amplificado num volume de reacção de 12,5 μL , contendo 6,25 μL de 2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 1,25 μL de Q-Solution (5x), 1,25 μL de Primer Mix (10x) e 0,5 μL de DNA, sendo as condições de PCR as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 15min, seguida de 10 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, *annealing* dos *primers* a 60°C durante 90s, extensão a 72°C durante 60s, seguida de mais 20 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, *annealing* dos *primers* a 58°C durante 90s, extensão a 72°C durante 60s. A extensão final ocorreu a 60°C durante 60min (Anexo I).

3.4 Genotipagem

A análise dos fragmentos amplificados foi realizada por electroforese capilar em condições desnaturantes usando o polímero POP4 (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) ou no ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems), utilizando as condições descritas nos kits de amplificação ou as descritas no protocolo do Decaplex fornecido pelo GEP-ISFG.

O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado automaticamente recorrendo ao *software* GeneScan v3.7 (Applied Biosystems). A determinação alélica foi realizada por comparação com um *ladder* alélico e recorrendo ao *software* GenoTyper v3.7 (Applied Biosystems), para os kits comerciais.

No caso do Decaplex, a determinação alélica foi realizada por comparação com o perfil genético de uma amostra de referência 9947A disponível no kit AmpF ℓ STR[®] Yfiler[™] (Applied Biosystems).

Antes de serem analisadas as amostras foram preparadas adicionando 1µL de produto amplificado a 14µL de uma mistura composta por Hi-Di™ Formamide – Genetic Analysis Grade (Applied Biosystems) e padrão interno (GeneScan™ – 500 ROX® Size Standard (Applied Biosystems) para o kit Argus X-8 (Mentype®) ou GeneScan™ – 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems) para o kit AmpFℓSTR® Yfiler™ (Applied Biosystems) e Decaplex, numa proporção de 24:1.

3.5 Sequenciação

As amostras que apresentavam tamanhos diferentes (microvariações²) quando comparadas com o *ladder* alélico foram sequenciadas de modo a confirmar-se o seu número de repetições nucleotídicas. Para a amplificação dos *loci* do cromossoma Y foram desenhados novos *primers* (quadro 7) recorrendo-se ao *software* disponível na internet PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Os *primers* desenhados foram testados no que respeita à sua especificidade usando o *software* disponível na página da internet do Center for Biomolecular Science & Engineering (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Para a amplificação dos *loci* do cromossoma X foram usados os mesmos *primers* da amplificação por *multiplex* (quadro 7), embora não estivessem marcados com fluorocromos.

Os padrões 007 (Applied Biosystems) e 9948 (Promega) foram utilizados como amostras de referência, tal como indicado Szibor *et al.* 2003 (Szibor *et al.* 2003a).

² Alelos raros que são encontrados na população humana e que diferem dos alelos comuns em um ou mais pb (Butler, 2005b).

Quadro 7 - Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados na sequenciação. F – *primer forward*; R – *primer reverse*.

<i>Locus</i>		Sequência nucleotídica (5'-3')
DXS6809	F	GGAGGACCATGTTTCACTGG
	R	TCACATCCTGAAAGGCATGA
DXS7132	F	CACTCCTGGTGCCAAACTCT
	R	TCAGACACTTAGCCTTTGATTGA
DXS9898	F	GAGAGCAGATTGCAAAAATGG
	R	GTGGAATGCCCTCGTGTAAT
DXS9902	F	CGAAACGCGCTATCTAAAGG
	R	GGAACAAACCTGCACATCCT
DYS448	F	TGAGACTTCCATGGGAGAGG
	R	TTCCCTGTGTTGGAGACCTT
DYS456	F	CTGCCCTCAAACATTGGACT
	R	CACCATGCCCAGCTATTTTT
DYS458	F	GGGTGGTGGAGGTTACTGTG
	R	AGGTTTCATGCCATTCTCCTG

3.5.1 Amplificação inicial de sequenciação

Este passo inicial tem como objectivo amplificar a zona desejada para a sequenciação. Para tal, foi usado o *kit* Qiagen® Multiplex PCR e cada *locus* foi amplificado isoladamente.

O DNA foi amplificado num volume de reacção de 25µL, contendo 12,5µL de 2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 2,5µL de Q-Solution (5x), 2,5µL de Primer Mix (10x) e 1µL de DNA, sendo as condições de PCR as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 15min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, *annealing* dos *primers* a T°C durante 90s, extensão a 72°C durante 60s. A extensão final ocorreu a 72°C durante 10min (Anexo I).

Nota: T°C é a temperatura de *annealing* dos *primers* durante a reacção de PCR, estando esta dependente do *locus* a analisar, tal como indicado no quadro 8.

Quadro 8 - Temperaturas de *annealing* para a amplificação de cada *locus*.

<i>Locus</i>	Temperatura <i>annealing</i> (°C)
DXS7132	61
DXS9898	61
DXS9902	61
DYS448	61
DYS456	60
DYS458	65

Antes de se prosseguir com a reacção de sequenciação, as amostras amplificadas anteriormente (3µL) foram analisadas num gel de agarose 2%. A presença ou ausência de produto amplificado foi visualizado num transiluminador de U.V. na presença de brometo de etídio. Apenas as amostras amplificadas foram sujeitas aos passos seguintes.

3.5.2 Purificação com MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen)

Este passo teve como objectivo purificar o DNA amplificado anteriormente. Para tal foi usado um *kit* comercial - MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen) – que combina um sistema de colunas com um sistema de membranas selectivas de gel de sílica. Numa primeira fase e na presença de sais, o DNA fica adsorvido à membrana de gel de sílica enquanto os contaminantes a atravessam. Posteriormente as impurezas são descartadas e o DNA purificado é eluído da membrana com tampão Tris ou com água (Anexo I).

3.5.3 Amplificação de sequenciação

Esta amplificação foi realizada recorrendo ao kit BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). A sequenciação tem como base o método descrito em 1977 por Sanger, que envolve a incorporação de dideoxiribonucleótidos trifosfatados (ddNTP) que actuam como terminadores da extensão. Cada ddNTP está marcado com um fluorocromo de cor diferente. A amplificação de DNA ocorre separadamente para cada uma das cadeias de DNA usando-se assim apenas um *primer* em cada reacção.

O DNA foi amplificado num volume de reacção de 10µL, contendo 0,75µL de BigDye Sequencing Buffer (5x), 1,5µL de Ready Reaction PreMix (2,5x), 1µL de Primer (3,2pmol/µL) e 1µL de DNA, sendo as condições de PCR as seguintes: desnaturação inicial a 96°C durante 1min, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10s, *annealing* dos *primers* a 50°C durante 5s, extensão a 60°C durante 4min (Anexo I).

3.5.4 Remoção dos terminadores com DyeEx 2.0 (Qiagen)

Após a reacção de sequenciação foi necessário remover os ddNTP não incorporados de modo a que estes não interferissem com o processo de análise da sequência. Para tal recorreu-se ao *kit* DyeEx 2.0 (Qiagen) que tem como base a purificação do material amplificado através de colunas com gel. Aquando da aplicação do produto amplificado na coluna, os ddNTP ficam retidos nos poros enquanto o DNA amplificado consegue atravessá-los (Anexo I).

Após a purificação das amostras, estas foram analisadas por electroforese capilar em condições desnaturantes usando o polímero POP4 (Applied Biosystems), num sequenciador automático ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems), recorrendo ao *software* Sequence Analysis 3.7 (Applied Biosystems).

3.6 Análise estatística

Os dados recolhidos foram inseridos em folhas de cálculo Excel tendo sido posteriormente transferidos para folhas de análise do SPSS (versão 13.0, SPSS Inc, 2004). O teste χ^2 foi usado para a comparação de variáveis categóricas com um nível de significância de 5%. O *odds ratio* (OD) e o seu intervalo de confiança a 95% (CI) foram calculados como medida de associação entre os genótipos e o risco de cancro da próstata.

4 Resultados

Devido ao grande número de haplótipos obtidos durante a realização desta tese apenas serão apresentados neste capítulo os dados já trabalhados, constando a totalidade dos resultados no Anexo II.

4.1 Cromossoma Y

A amplificação do cromossoma Y foi realizada com o recurso do *kit* AmpFℓSTR® Y-Filer™ (Applied Biosystems). Este *kit* permite a amplificação de 16 *loci* numa única reacção de PCR (PCR *multiplex*). A localização cromossómica de cada um dos *loci* encontra-se descrita no quadro 9.

Quadro 9 - Localização cromossómica dos *loci* amplificados através do *kit* AmpFℓSTR® Y-Filer™ (Applied Biosystems).

<i>Locus</i>	Região do cromossoma
DYS19	Yp11.2
DYS385	Yq11.222
DYS389I	Yq11.21
DYS389II	Yq11.21
DYS390	Yq11.221
DYS391	Yq11.21
DYS392	Yq11.222
DYS393	Yp11.2
DYS437	Yq11.21
DYS438	Yq11.21
DYS439	Yq11.21
DYS448	Yq11.223
DYS456	Yp11.2
DYS458	Yp11.2
DYS635	Yq11.21
YGATA H4	Yq11.221

Como população controlo foram usados 175 indivíduos aparentemente saudáveis do Norte de Portugal que já se encontravam tipados com este mesmo *kit* comercial (Pontes *et al.* 2007).

Para maior facilidade de estudo, os diferentes *loci* do cromossoma Y foram analisados segundo a sua localização cromossómica, constituindo-se assim 5 grupos diferentes (Yp11.2, Yq11.21, Yq11.222 e Yq11.223).

4.1.1 Região Yp11.2

Nesta região encontram-se os *loci* DYS393, DYS456, DYS458 e DYS19. A distribuição alélica de cada um dos *loci* foi comparada entre os dois grupos e apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas para o *locus* DYS393 (quadro 10).

Quadro 10 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) para os *loci* da região Yp11.2.

alelo	DYS19		DYS393		DYS456		DYS458	
	N	C	N	C	N	C	N	C
11			0,0	0,4	0,0	0,4		
12	0,6	0,0	20,6	11,0			0,6	0,0
13	12,0	12,8	65,1	78,6	1,1	2,8		
14	56,6	55,5	12,0	9,3	9,7	8,2	4,6	2,8
15	22,9	27,4	2,3	0,7	45,7	45,6	9,7	11,7
16	6,3	3,2			31,4	29,9	20,0	19,2
16.2							0,0	0,4
17	1,7	1,1			9,7	11,7	30,3	38,8
17.2							0,0	1,4
18					2,3	1,4	21,1	17,8
18.2							0,0	0,4
19							11,4	5,7
19.2							0,0	0,7
20							2,3	1,1
χ^2	p=0,388		p=0,012		p=0,772		p=0,130	

Posteriormente, alguns alelos foram analisados individualmente uma vez que as suas frequências eram moderadamente diferentes entre os dois grupos populacionais. Deste modo, verificou-se que indivíduos portadores do alelo 12 do marcador DYS393 têm um menor risco de desenvolverem cancro da próstata ($p=0,005$; OR 0,48; 95% IC 0,27–0,83) (quadro 11). Este mesmo efeito foi observado para os indivíduos portadores do alelo 19 do marcador DYS458 ($p=0,027$; OR 0,47; 95% IC 0,22–0,98) (quadro 11). Pelo contrário, os indivíduos portadores do alelo 13 do marcador DYS393 têm um maior risco de desenvolverem cancro da próstata ($p=0,002$; OR 1,97; 95% IC 1,26–3,07) (quadro 11). Uma vez que alguns alelos têm um efeito protector e outros de risco foi analisado o impacto da existência conjunta de alelos protectores (alelo 12 do DYS393 e alelo 19 do DYS458) e de alelos de risco (alelo 13 do DYS393 e outro que não o 19 do DYS458) na susceptibilidade para o cancro da próstata (quadro 11). Verificou-se que no primeiro caso, ou seja, homens portadores dos dois alelos protectores em causa, encontram-se sobre-representados no grupo controlo (homens

“normais”) (11 em 175 vs nenhum em 282 no grupo do cancro da próstata; $p < 0,001$). Pelo contrário, os homens portadores dos alelos de risco (13/não 19) apresentam um maior risco de desenvolverem cancro da próstata ($p = 0,0043$; OR 1,79; 95% IC 1,17–2,74) (quadro 11).

Quadro 11 - Frequências alélicas dos *loci* DYS393 e DYS458 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata. (OR, *odds ratio*; CI, intervalo de confiança; *teste χ^2).

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	Controlos (n)	Casos (n)	p*	O.R.	95% IC
DYS393	12	36/175	31/281	0,005	0,48	0,27-0,83
	13	114/175	221/281	0,002	1,97	1,26–3,07
DYS458	19	20/175	16/281	0,027	0,47	0,22–0,98
DYS393 + DYS458	12 ; 19	11/175	0/281	<0,001	-	-
	13 ; outro que não o 19	106/175	207/281	0,004	1,79	1,17–2,74

4.1.2 Região Yq11.21

Nesta região encontram-se os *loci* DYS389I, DYS389II, DYS391, DYS437, DYS438, DYS439 e DYS635. A distribuição alélica de cada um dos *loci* foi comparada entre os dois grupos não tendo sido observadas quaisquer diferenças estatisticamente significativas (quadro 12).

Quadro 12 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) para os *loci* da região Yq11.21.

alelo	DYS389I		DYS389II		DYS391		DYS437		DYS438		DYS439		DYS635	
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C
8					0,0	0,4			0,6	0,4				
9					5,1	6,0			11,4	7,1	0,0	0,7		
10	0,0	0,4			50,3	46,3			29,1	27,8	4,0	7,8		
11	0,6	0,0			42,3	46,3			5,1	5,3	33,7	28,8		
12	16,6	16,0			2,3	0,7			50,9	56,6	47,4	48,8		
13	65,7	61,6			0,0	0,4	0,0	0,4	2,9	2,8	14,3	12,5		
14	16,6	21,4					36,6	34,2			0,6	1,4		
15	0,6	0,7					51,4	53,0						
16							11,4	12,5						
17							0,6	0,0						
20													2,9	4,6
21													20,6	18,9
22													8,6	8,2
23													52,0	56,2
24													12,0	11,4
25													4,0	0,7
26			0,6	0,7										
27			2,9	0,4										
28			13,1	13,9										
29			48,0	44,5										
30			24,6	28,5										
31			8,0	9,6										
32			2,9	2,5										
χ^2	p=0,573		p=0,373		p=0,524		p=0,635		p=0,680		p=0,347		p=0,197	

No entanto, tal como realizado para a região cromossômica anterior, alguns alelos foram analisados isoladamente uma vez que as diferenças observadas anteriormente apontavam para a existência de um efeito protector. Deste modo, verificou-se que indivíduos portadores do alelo 27 do marcador *DYS389II* têm um menor risco de desenvolverem cancro da próstata ($p=0,023$; OR 0,121; 95% IC 0,014-1,048) (quadro 13). Este mesmo efeito foi observado para os indivíduos portadores do alelo 25 do marcador *DYS635* ($p=0,014$; OR 0,172; 95% IC 0,035–0,838) (quadro 13). Uma vez que ambos os alelos têm um efeito protector para o desenvolvimento do cancro da próstata foi analisado o seu efeito alternativo. Sendo assim, verificou-se, tal como esperado, que indivíduos portadores do alelo 27 (*DYS389II*) ou do alelo 25 (*DYS635*) têm um menor risco de desenvolverem a patologia em estudo ($p=0,001$; OR 0,147; 95% IC 0,041-0,527) (quadro 13).

Quadro 13 - Frequências alélicas dos *loci* DYS389II e DYS635 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata. (OR, *odds ratio*; CI, intervalo de confiança; *teste χ^2).

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	Controlos (n)	Casos (n)	p*	O.R.	95% IC
DYS389II	27	5/175	1/281	0,023	0,121	0,014-1,048
DYS635	25	7/175	2/281	0,014	0,172	0,035-0,838
DYS389II + DYS635	27 + 25	12/175	3/281	0,001	0,147	0,041-0,527

4.1.3 Região Yq11.221

Nesta região encontram-se os *loci* DYS390 e YGATAH4. A distribuição alélica de cada um dos *loci* foi comparada entre os dois grupos não tendo sido observadas quaisquer diferenças estatisticamente significativas (quadro 14).

Quadro 14 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) para os *loci* da região Yq11.221.

alelo	DYS390		YGATAH4	
	N	C	N	C
9			1,1	0,4
10			1,7	2,5
11			32,0	34,2
12			58,3	59,1
13			6,9	3,9
21	2,9	2,8		
22	10,3	7,5		
23	19,4	20,6		
24	55,4	58,0		
25	9,1	10,3		
26	2,3	0,7		
27	0,6	0,0		
χ^2	p=0,545		p=0,505	

4.1.4 Região Yq11.222

Nesta região encontram-se os *loci* DYS385 e DYS392. A distribuição alélica de cada um dos *loci* foi comparada entre os dois grupos não tendo sido observadas quaisquer diferenças estatisticamente significativas (quadro 15).

Quadro 15 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) para os *loci* da região Yq11.222.

alelo	DYS385		alelo	DYS385		alelo	DYS392	
	N	C		N	C		N	C
8-14	0,0	0,4	13-17	4,0	1,1	10	0,6	0,4
10-12	0,0	0,4	13-18	0,6	0,0	11	36,0	32,7
10-13	0,0	0,7	13-19	1,1	0,4	12	5,7	2,8
10-14	0,6	1,1	14-14	1,1	3,9	13	53,7	58,0
11-11	1,7	1,4	14-15	2,9	1,8	14	4,0	5,0
11-12	2,3	0,4	14-16	2,3	0,7	15	0,0	1,1
11-13	4,0	2,5	14-17	1,1	1,1			
11-14	30,3	34,6	14-18	0,6	0,4			
11-15	11,4	8,6	14-19	0,6	0,0			
11-16	0,0	1,4	15-15	1,7	1,4			
11-17	0,0	0,7	15-16	0,6	2,5			
12-12	2,9	1,4	15-17	0,6	0,7			
12-13	0,6	1,1	15-18	1,1	0,4			
12-14	3,4	7,1	16-16	0,6	0,4			
12-15	3,4	1,4	16-17	1,1	1,1			
12-16	0,0	1,8	16-18	2,3	1,4			
12-17	0,6	0,4	16-19	1,1	0,7			
12-20	0,6	0,0	16-20	0,6	0,0			
13-13	0,0	0,7	17-17	0,6	1,8			
13-14	5,1	6,1	17-18	0,6	1,1			
13-15	4,6	4,3	18-18	0,0	0,7			
13-16	3,4	2,1						
χ^2	p=0,241					χ^2	p=0,399	

No entanto, alguns alelos foram analisados isoladamente tendo-se verificado que indivíduos portadores dos alelos 13 e 17 em simultâneo (13,17) têm um menor risco de desenvolverem cancro da próstata quando comparados com indivíduos não portadores destes alelos (p=0,038; OR 0,259; 95% IC 0,066–1,015) (quadro 16).

Quadro 16 - Frequências alélicas dos *loci* *DYS392* e *DYS385* no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata. (OR, *odds ratio*; CI, intervalo de confiança; *teste χ^2).

<i>Locus</i>	Alelo	Controlos (n)	Casos (n)	p*	O.R.	95% IC
DYS392	12	10/175	8/281	0,126	0,484	0,187-1,250
DYS385	12,14	6/175	20/281	0,099	2,158	0,849-5,48
DYS385	13,17	7/175	3/281	0,038	0,259	0,066-1,015
DYS385	14,14	2/175	11/281	0,084	3,524	0,772-16,092

4.1.5 Região Yq11.223

Nesta região encontra-se apenas o *locus* DYS448. A distribuição alélica deste *locus* foi comparada entre os dois grupos não tendo sido observadas quaisquer diferenças estatisticamente significativas (quadro 17).

Quadro 17 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) para os *loci* da região Yq11.223.

alelo	DYS448	
	N	C
17	0,6	0,4
18	8,6	8,2
19	48,6	55,4
20	24,6	25,7
21	13,7	7,9
22	2,9	1,8
23	1,1	0,7
χ^2	p=0,473	

Uma vez que a frequência do alelo 21 no grupo dos indivíduos com cancro da próstata é quase duas vezes inferior à frequência no grupo de indivíduos “normais” este alelo foi analisado individualmente. Verificou-se que os indivíduos portadores do alelo 21 apresentam um menor risco de desenvolverem cancro da próstata quando comparados com indivíduos não portadores deste alelo ($p=0,042$; OR 0,534; 95% IC 0,290–0,986).

4.1.6 Microvariações no *locus* DYS458

Algumas amostras de DNA de indivíduos com cancro da próstata foram sequenciadas uma vez que aquando da sua atribuição alélica através do *software* GenoTyper v3.7 (Applied Biosystems), este as colocava fora da escala. Para além das amostras em causa, foi também sequenciada uma amostra de referência (007 – Applied Biosystem). Através desta análise, verificou-se que as amostras possuíam na realidade microvariações, sendo estas caracterizadas pela existência de *deleções* ou inserções no motivo de repetição tal como é possível observar no quadro 18. Foram sequenciadas as duas cadeias em todas as amostras de modo a confirmarem-se os resultados obtidos. Neste trabalho, usou-se o conceito de microvariação definido por Butler – alelos raros

que são encontrados na população humana e que diferem dos alelos comuns em um ou mais pb (Butler, 2005b).

Quadro 18 - Caracterização das microvariações encontradas nas amostras de indivíduos com cancro da próstata.

Amostra	Alelo	Caracterização do alelo
3781	16.2	Inserção de dois nucleótidos (AA) entre a repetição 14 e 15
3730	17.2	<i>Deleção</i> de dois nucleótidos (AA) entre a repetição 11 e 12
3703	17.2	Inserção de dois nucleótidos (AA) entre a repetição 15 e 16
3568	17.2	Inserção de dois nucleótidos (AA) entre a repetição 15 e 16
3858	17.2	Inserção de dois nucleótidos (AA) entre a repetição 15 e 16
3734	18.2	Inserção de dois nucleótidos (AA) entre a repetição 16 e 17
3927	19.2	Inserção de dois nucleótidos (AA) entre a repetição 17 e 18
3817	19.2	Inserção de dois nucleótidos (AA) entre a repetição 17 e 18

Na população de indivíduos “normais” não foi encontrada qualquer microvariação para este sistema, estando estas sobre-representadas no grupo de indivíduos com patologia (9 em 282 no grupo de cancro da próstata vs nenhum em 175 no grupo controlo; $p=0,026$). Este resultado sugere a existência de risco acrescido de cancro da próstata para os portadores de microvariações no *locus* DYS458.

Na figura 2 é possível observar um exemplo de uma inserção e de uma *deleção* na sequência de DNA, tal como foi verificado nas amostras que apresentavam microvariações.

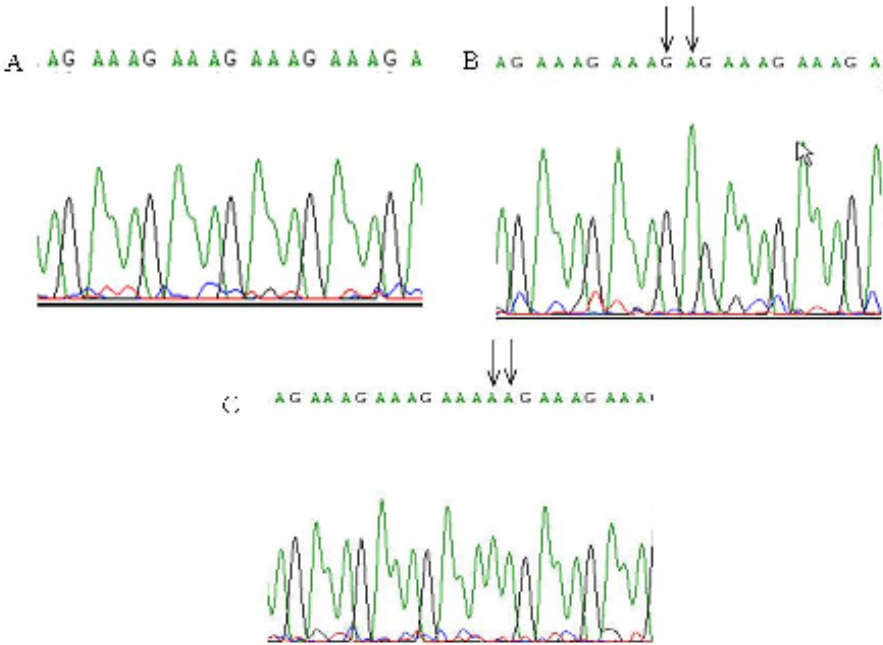


Figura 2 – Exemplos de uma inserção e de uma *deleção* em amostras com microvariações. O motivo de repetição é GAAA. (A) amostra de referência (007 – Applied Biosystems); (B) amostra com *deleção* de dois nucleótidos (AA). O motivo de repetição encontra-se incompleto; (C) amostra com inserção de dois nucleótidos (AA). O motivo de repetição tem mais dois nucleótidos.

4.1.7 Descrição de um novo alelo para o *locus* DYS456

Aquando da análise no GenoTyper v3.7 (Applied Biosystems), uma das amostras (3609) apresentava um alelo que estava fora da escala, tendo um tamanho de 96,12pb (figura 3). Tendo em conta que o *locus* DYS456 é um STR tetramérico (AGAT) e que o primeiro alelo do *ladder* fornecido no kit (alelo 13) tem um tamanho de 103,78, o pico observado poderá corresponder ao alelo 11.

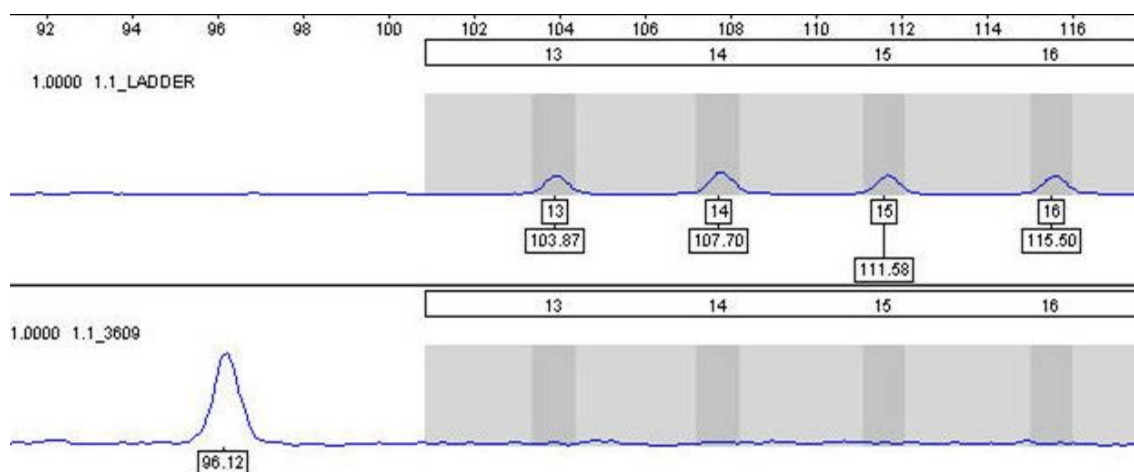


Figura 3 – Electroforetograma do *ladder* alélico e da amostra 3609 para o *locus* DYS456.

No entanto, para se confirmar esta observação, foram sequenciadas duas amostras: a amostra em causa e uma amostra de referência (007 – Applied Biosystems). A sequenciação revelou que a amostra possuía de facto apenas 11 repetições e que a sua sequência nucleotídica era semelhante à da amostra de referência, diferindo as duas apenas no número de repetições que cada uma apresentava (Anexo III). Foram sequenciadas as duas cadeias em todas as amostras de modo a confirmarem-se os resultados obtidos.

4.1.8 Deleção no *locus* DYS448

Aquando da análise da amostra 4000 no GenoTyper v3.7 (Applied Biosystems), verificou-se que o *locus* DYS448 não tinha amplificado e portanto foi questionada a existência de mutações na zona de *annealing* dos *primers*. Para se confirmar esta hipótese construíram-se novos *primers* que emparelhassem noutra região e que estivessem mais afastados da sequência repetitiva em causa. No entanto, mesmo com os

novos *primers* não foi possível a amplificação deste *locus* na amostra em causa e consequentemente, não foi viável sequenciar a mesma.

4.2 Cromossoma X

A amplificação dos *loci* do cromossoma X foi realizada recorrendo-se a um *kit* comercial (Argus X-8 (Mentype[®])) e a um *multiplex* de um trabalho colaborativo do GEP-ISFG (Decaplex-X). Uma vez que os *loci* amplificados se encontram espalhados ao longo de todo o cromossoma não foi possível o seu agrupamento em *clusters* tal como foi feito para os *loci* do cromossoma Y. Os dados obtidos com o *kit* comercial e com o método manual foram analisados separadamente, uma vez que a amostra de indivíduos “normais” era diferente.

4.2.1 Argus X-8 (Mentype[®])

A distribuição alélica de cada um dos *loci* foi comparada entre os dois grupos tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas para o *locus* DXS10135 (quadro 20). Não foram observadas diferenças para os outros *loci* amplificados através deste *kit* (quadro 19 e quadro 20).

Quadro 19 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) dos *loci* DXS8378, HPRTB, DXS7423, DXS7132 e DXS10074 amplificados com o *kit* Argus X-8 (Mentype®).

alelo	DXS8378		HPRTB		DXS7423		DXS7132		DXS10074	
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C
7									4,2	2,8
8									14,9	13,9
9	0,6	1,4	0,0	0,7					1,9	2,1
10	29,1	34,5	1,3	0,7					0,3	0,0
10.2			0,0	0,7						
11	36,2	27,8	14,9	12,1			0,6	2,8	0,0	0,4
11.3			0,3	0,0						
12	30,1	33,5	36,2	38,4			14,9	13,9	0,0	1,1
13	3,6	2,1	29,1	32,4	9,1	7,1	25,6	32,4	0,6	0,7
13.2			0,3	0,0			0,3	0,0		
13.3							0,3	0,0		
14	0,3	0,7	13,6	12,1	29,8	30,2	34,0	28,8	1,6	1,4
14.2							1,0	0,0		
15			3,2	2,8	37,9	42,0	17,5	18,1	10,0	10,0
15.1					0,3	0,0				
15.2							0,3	0,0		
16			0,6	0,0	20,4	19,2	4,2	2,5	15,5	19,9
16.2									0,3	1,4
17			0,3	0,0	2,6	1,4	1,3	1,4	21,4	23,5
17.2									0,3	0,0
18									19,7	16,7
19									7,4	5,7
20									1,3	0,4
21									0,3	0,0
χ^2	p=0,185		p=0,418		p=0,651		p=0,143		p=0,523	

Quadro 20 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) dos *loci* DXS10134, DXS10101 e DXS10135 amplificados com o *kit* Argus X-8 (Mentype®).

alelo	DXS10134		DXS10101		alelo	DXS10135	
	N	C	N	C		N	C
24.2			0,3	0,0	15.2	0,3	0,0
25					17	3,6	2,8
25.1					17.2	0,3	0,0
25.2			0,3	0,0	18	4,5	3,9
26			0,3	0,0	18.2	0,3	0,0
26.2			1,0	1,4	19	5,2	5,0
27			0,3	1,4	19.1	0,0	1,8
27.2			5,5	2,5	20	7,4	7,8
28			3,6	4,3	21	8,4	11,0
28.2			10,4	12,5	21.1	2,9	3,9
29			3,2	4,3	22	6,8	7,1
29.2			15,2	14,9	22.1	1,3	0,0
30	0,3	0,0	6,1	9,6	23	11,0	6,4
30.1			4,2	0,0	23.1	2,6	0,7
30.2			14,2	12,8	24	5,2	7,8
31	0,3	0,7	11,3	7,8	25	3,2	6,8
31.2			10,0	10,3	25.1	4,2	0,0
32	1,0	1,4	4,5	7,1	26	8,1	10,7
32.2			3,2	4,3	27	6,5	4,3
33	3,9	4,6	2,3	3,6	28	7,1	6,4
33.1			0,3	0,0	29	4,2	7,1
33.2			0,6	1,4	30	2,3	1,8
34	8,4	9,3	2,3	1,8	31	2,6	2,5
34.2			0,3	0,0	32	0,6	0,7
35	17,5	13,2			33	1,3	0,7
36	24,9	23,5			34	0,0	0,7
37	15,5	18,9					
37.2	0,3	0,0					
37.3	1,0	0,0					
38	6,5	10,0	0,3	0,0			
38.3	3,2	1,4					
39	1,6	2,5					
39.3	5,5	5,0					
40	0,0	0,7					
40.3	3,9	2,1					
41							
41.3	4,5	2,5					
42							
42.3	1,6	2,8					
43							
43.3	0,0	1,4					
χ^2	p=0,153		p=0,069		χ^2	p=0,008	

Tal como foi realizado para determinados *loci* do cromossoma Y, foram também analisados separadamente dois alelos. Assim sendo, verificou-se que indivíduos portadores do alelo 11 (DXS8378) ou do alelo 23 (DXS10135) apresentam um menor

risco de desenvolvimento de cancro da próstata quando comparados com indivíduos não portadores destes alelos ($p=0,028$; OR 0,676; 95% IC 0,477–0,958; $p=0,049$; OR 0,554; 95% IC 0,305–1,004) (quadro 21).

Quadro 21 - Frequências alélicas dos *loci* DXS8378 e DXS10135 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata (casos). (OR, *odds ratio*; CI, intervalo de confiança; *teste χ^2).

<i>Locus</i>	Alelo	Controlos (n)	Casos (n)	p^*	O.R.	95% IC
DXS8378	11	112/309	78/281	0,028	0,676	0,477-0,958
DXS10135	23	34/309	18/281	0,049	0,554	0,305-1,004

4.2.2 Decaplex - X

A distribuição alélica de cada um dos *loci* foi comparada entre os dois grupos não tendo sido observadas quaisquer diferenças estatisticamente significativas (quadro 22 e quadro 23). No entanto, a análise de determinados alelos revelou que indivíduos portadores do alelo 11 do *locus* GATA172D05 têm um menor risco de desenvolverem cancro da próstata quando comparados com indivíduos não portadores deste alelo ($p=0,027$; OR 0,621; 95% IC 0,405–0,950) (quadro 24). O mesmo foi verificado para os indivíduos portadores do alelo 12 do *locus* DXS9902 ($p=0,045$; OR 0,664; 95% IC 0,444–0,993) (quadro 24).

Quadro 22 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) dos *loci* DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA 172D05 e DXS9902 amplificados através do *multiplex* Decaplex-X.

alelo	DXS8378		DXS9898		DXS7133		GATA31E08		GATA172D05		DXS9902	
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C
6							0,3	0,0	18,4	18,9		
7							21,0	25,6	0,0	0,4		
8							2,2	1,8	16,2	20,3	0,6	1,1
8.3			26,0	27,0								
9	1,6	2,1	0,3	0,4	40,3	46,6	19,0	16,7	6,3	8,9	2,9	2,8
10	32,1	33,1	0,0	1,1	17,5	17,8	15,9	17,4	28,3	26,0	30,8	34,5
11	36,2	30,6	17,8	22,1	36,5	30,6	28,6	25,6	21,6	14,6	40,0	43,4
12	27,0	32,7	31,4	28,1	4,8	3,2	13,0	11,4	8,9	11,0	24,1	17,4
13	2,9	1,1	18,7	17,4	1,0	0,7	0,0	1,4	0,3	0,0	1,6	0,7
14	0,3	0,4	5,1	2,8	0,0	0,7						
15			0,6	1,1	0,0	0,4						
χ^2	p=0,337		p=0,364		p=0,297		p=0,300		p=0,211		p=0,356	

Quadro 23 - Frequências alélicas (em %) em indivíduos “normais” (N) e em indivíduos com cancro da próstata (C) dos *loci* DXS7423, DXS7132, DXS6789 e DXS6809 amplificados através do *multiplex* Decaplex-X.

Alelo	DXS7423		DXS7132		DXS6789		alelo	DXS6809	
	N	C	N	C	N	C		N	C
11			1,0	1,4			27	1,3	1,1
12			14,9	11,7			28	0,3	1,8
13	6,7	9,3	26,7	32,0			29	2,2	2,1
14	32,7	31,7	35,6	28,8			30	4,4	2,8
15	37,1	39,1	17,1	22,4	5,4	7,1	31	19,4	18,9
16	20,6	18,5	3,2	2,5	3,2	2,8	32	15,6	16,4
16.1			0,3	0,0			33	27,0	29,2
17	2,9	1,4	1,0	1,1	0,6	0,7	34	15,2	16,0
18			0,3	0,0	0,3	0,0	35	10,2	8,9
19					1,0	1,1	36	3,2	2,8
20					40,6	44,5	37	0,6	0,0
21					23,2	19,9	38	0,6	0,0
22					16,5	14,9			
23					8,6	8,2			
24					0,6	0,4			
25					0,0	0,4			
χ^2	p=0,524		p=0,335		p=0,920		χ^2	p=0,668	

Quadro 24 - Frequências alélicas dos *loci* GATA172D05, DXS9902 e DXS8378 no grupo controlo e no grupo de cancro da próstata. (OR, *odds ratio*; CI, intervalo de confiança; *teste χ^2).

<i>Locus</i>	Alelo	Controlos (n)	Casos (n)	p*	O.R.	95% IC
GATA172D05	11	68/315	41/281	0,027	0,621	0,405-0,950
DXS9902	12	76/315	49/281	0,045	0,664	0,444-0,993
DXS8378	11	114/315	86/281	0,149	0,778	0,552-1,095

4.2.3 Sequenciação

Algumas amostras dos *loci* DXS9902, DXS9898 e DXS7132 foram sequenciadas para confirmar a existência de microvariações nas mesmas. Para além das amostras em causa foi também sequenciada uma amostra de referência.

Através da análise de sequenciação verificou-se que, com excepção da amostra A270, as microvariações observados no *locus* DXS9902 eram devidas à inserção de uma timina na sequência de DNA antes da sequência de repetição e não devidas à existência de microvariações (quadro 25 e Anexo III). As amostras sequenciadas para o *locus* DXS7132 e a amostra A270 sequenciada para o *locus* DXS9902 não revelaram a

presença de quaisquer inserções ou *deleções* na sequência de DNA (quadro 25 e Anexo III). Estas amostras apenas diferem da amostra de referência no número de repetições que apresentam. As amostras sequenciadas para o *locus* DXS9898 possuem uma repetição incompleta de 3 nucleótidos em vez da sequência completa de 4 nucleótidos. Verificou-se também que a amostra 3781 para além de possuir uma sequência de repetição incompleta possui ainda uma *deleção* de uma timina após a sequência de repetição (quadro 25 e Anexo III). Foram sequenciadas as duas cadeias em todas as amostras de modo a confirmarem-se os resultados obtidos.

Quadro 25 - Resultados da sequenciação para os *loci* DXS9902, DXS9898 e DXS7132. Alelo 1 – alelo antes da sequenciação; Alelo 2 – alelo corrigido após a sequenciação.

<i>Locus</i>	<i>Amostra</i>	<i>Alelo 1</i>	<i>Alelo 2</i>	<i>Descrição</i>
DXS9902	A270	9.3	10	
	A294	11.1	11	Inserção de uma adenina antes da sequência de repetição
	A300	11.1	11	Inserção de uma adenina antes da sequência de repetição
	A313	10.1	10	Inserção de uma adenina antes da sequência de repetição
	3710	11.1	11	Inserção de uma adenina antes da sequência de repetição
	3713	11.1	11	Inserção de uma adenina antes da sequência de repetição
	9947A	11	11	Amostra referência
	9948	12	12	Amostra referência
DXS9898	A056	8.2	8.3	Sequência de repetição incompleta
	A151	8.2	8.3	Sequência de repetição incompleta
	A170	8.2	8.3	Sequência de repetição incompleta
	3781	8.1	8.3	Sequência de repetição incompleta
	3830	8.3	9	<i>Deleção</i> de uma timina após sequência de repetição
	3907	8.2	8.3	Sequência de repetição incompleta
	3925	8.2	8.3	Sequência de repetição incompleta
	3930	8.2	8.3	Sequência de repetição incompleta
	9948	13	13	Amostra referência
DXS7132	A037	16.1	16	
	A098	16.1	16	
	A106	17.1	17	
	A221	17.1	17	
	A261	17.1	17	
	3731	17.1	17	
	3746	16.1	16	
	3751	17.1	17	
	3918	16.1	16	
	4000	16.1	16	
	9947A	12	12	Amostra referência
	9948	13	13	Amostra referência

5 Discussão

Tal como explanado na introdução deste trabalho, os STR para além de desempenharem um papel fundamental no campo da genética forense são também uma ferramenta útil para a realização de estudos de *screening* do genoma humano, de modo a auxiliar os investigadores na pesquisa de genes que possam estar envolvidos no desenvolvimento de determinadas patologias. Esta tese foi desenhada tendo em conta esta última utilidade dos STR, estando focada nos STR do cromossoma X e do cromossoma Y devido ao papel desempenhado por estes dois cromossomas no desenvolvimento do cancro da próstata.

A hipótese colocada durante a realização deste trabalho é que determinados STR possam estar em desequilíbrio de *linkage* ou alterar de forma ainda não conhecida, a expressão genética de genes essenciais para o desenvolvimento da patologia em estudo. Em 2004, Porkka & Visakorpi demonstraram que as regiões não codificantes do genoma (como por exemplo os STR) poderiam desempenhar um papel fundamental na alteração da função do gene. No entanto, ainda é muito difícil prever quais as consequências das variações que se encontram fora das regiões codificantes (Porkka & Visakorpi, 2004). Posteriormente, em 2005, Riley demonstrou que alguns STR que são transcritos como sequências 5' e 3' que não vão ser traduzidas (UTR – *untranslated sequences*) estão sob pressão selectiva incluindo a conservação de STR, substituições STR-STR entre espécies e variações de STR implicadas em determinadas doenças (Riley & Krieger, 2005). Estes mesmos autores estudaram as substituições que ocorrem em UTR perto de genes implicados em determinadas doenças, como por exemplo o cancro da próstata, em diferentes espécies e concluíram que algumas substituições alteravam a expressão genética, concluindo que os STR poderão contribuir para o processo de desenvolvimento da patologia (Riley & Krieger, 2005). Esta mesma conclusão já foi obtida num estudo com o marcador TH01 para a doença esquizofrénica (Thibaut *et al.* 1997).

Para melhor compreensão da discussão dos resultados, estes irão ser apresentados em separado para os dois cromossomas.

5.1 Cromossoma Y

Vários trabalhos já demonstraram que o material genético do cromossoma Y parece estar envolvido de uma forma ainda não esclarecida no desenvolvimento do cancro da próstata. Até à data verificou-se a existência neste cromossoma de um *locus* que favorece a formação de tumores (GBY – *gonadoblastoma on the Y chromosome*) (Lau *et al.* 2003), de oncogenes e genes supressores de tumores que actuam em fases diferentes da tumorigénese (Lau, 1999). Para além destas observações, estudos de expressão genética em células tumorais da próstata demonstraram que o cromossoma Y sofre *deleções*, sendo este um fenómeno frequente (Perinchery *et al.* 2000). Através da técnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*), Jordan *et al* chegaram à conclusão que a porção mais frequentemente *deletada* era Yp, não tendo encontrado nenhuma perda total deste cromossoma (Jordan *et al.* 2001). Uma outra evidência que corrobora o papel do cromossoma Y no desenvolvimento do cancro da próstata é a cessação da actividade tumoral numa linha celular deste tipo de cancro, aquando da introdução do cromossoma Y na mesma (Vijayakumar *et al.* 2005).

Através da análise deste cromossoma por Y-STR, foi possível verificar que alguns alelos de determinados *loci* podem ter um papel protector ou de risco para a patologia em estudo. As regiões cromossómicas nas quais se situavam *loci* com possíveis alelos protectores ou de risco foram as regiões Yp11.2, Yq11.21, Yq11.222 e Yq11.223 excluindo-se só a região Yq11.222 (na qual não foram observadas diferenças entre indivíduos “normais” e indivíduos com cancro da próstata). Após a análise dos resultados, foram pesquisados genes que se localizassem na mesma região cromossómica dos *loci* em questão, de modo a elucidar e a explicar o melhor possível os dados recolhidos neste trabalho.

Foram observados como possíveis alelos protectores o alelo 19 do *locus* DYS458, o alelo 13 do *locus* DYS393, o alelo 27 do *locus* DYS389II, o alelo 25 do *locus* DYS635, o alelo 21 do *locus* DYS441 e os alelos 13 e 17 em simultâneo (13,17) do *locus* DYS385. Pelo contrário, foi observado como possível alelo de risco apenas o alelo 19 do *locus* DYS393.

Os *loci* DYS458 e DYS393 localizam-se na região Yp11.2, bem como o gene *TSPY* (figura 4). Este gene forma um *cluster* de genes que se encontram repetidos 20 a 40 vezes ao longo do braço curto do cromossoma Y, sendo cada cópia constituída por seis exões e cinco intrões (Lau, 1999; Lau & Zang, 2000; Lau *et al.* 2003). A expressão do

gene está dependente da actividade espermatogénica e do ambiente hormonal (Lau, 1999). A proteína que é codificada possui um domínio β -ciclina que tem grande homologia com o oncogene *SET* e com proteínas NAT (*nucleosome assembly proteins*), estando estas envolvidas na regulação e/ou modulação do ciclo celular (Lau *et al.* 2003; Lau & Zang, 2000). Já foi verificado que o gene *TSPY* tem expressão anormal em células de cancro da próstata (Lau, 1999; Lau *et al.* 2003; Dasari *et al.* 2001; Lau & Zang, 2000; Perinchery *et al.* 2000), podendo estar *deletado* (Vijakumar *et al.* 2006).

Figura 4 – Localização cromossômica (em pb) dos *loci* do cromossoma Y em estudo e de genes que possam estar em desequilíbrio de *linkage* com eles (adaptado de Hanson & Ballantyne, 2006).

conferir aos seus portadores diferentes susceptibilidades para o desenvolvimento de cancro da próstata (Ewis *et al.* 2002). No decorrer deste estudo, não foram encontradas quaisquer diferenças para este marcador. No entanto, há que ter em conta que a contribuição de determinado marcador para o risco ou susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro da próstata está dependente da população em estudo, bem como de determinados factores ambientais e dietéticos a que a população está sujeita (Medeiros *et al.* 2004).

Os *loci* DYS389II e DYS635 localizam-se na região Yq11.21 bem como o gene *USP9Y* (Figura 4). Este gene codifica uma protease específica de ubiquitinas (USP - *ubiquitin specific protease*) sendo esta responsável pela clivagem de conjugados de ubiquitina em vários substratos. Deste modo as USP regulam e reciclam a ubiquitina que está envolvida no controlo do crescimento celular, diferenciação e apoptose. Para além destes fenómenos, as USP exercem diversas actividades reguladoras actuando como oncogenes ou genes supressores de tumores. A expressão de *USP9Y* está presente nas células de cancro da próstata (Dasari *et al.* 2001) e a sua sobre-expressão está relacionada com um fenótipo mais maligno em carcinomas da próstata bem como em carcinomas do pulmão, rim e mama (Deng *et al.* 2007).

O *locus* DYS385 localiza-se na mesma região dos gene *EIF1AY* e *SMCY* (Yq11.222) enquanto o *locus* DYS448 se encontra na mesma região que os genes *RPS4Y2*, *RBMY1D*, *PRY*, *BPY2*, *DAZ* e *CDY1* (Yq11.223) (figura 4). Estudos de expressão genética realizados por diversos autores demonstraram que a expressão anormal destes genes é um evento frequente no cancro da próstata (Perinchery *et al.* 2000; Dasari *et al.* 2001; Lau & Zang, 2000). Durante a realização de vários estudos os autores verificaram que o gene *SMCY* se encontra *deletado* em 52% dos casos analisados. Este mesmo gene codifica uma proteína que tem homologia com uma proteína encontrada no rato, cuja função é controlar a espermatogénese e a expressão de antigénios *minor* de histocompatibilidade (Perinchery *et al.* 2000; Dasari *et al.* 2001). Tal como o gene anterior, o *BPY2* encontra-se *deletado* em 42% dos casos (Perinchery *et al.* 2000). Este gene codifica uma proteína com o mesmo nome, cuja função é desconhecida (Perinchery *et al.* 2000; Lau & Zang, 2000). *PRY* é um gene repetido que codifica uma proteína homóloga a uma proteína tirosina fosfatase. As proteínas cinases e fosfatases têm funções opostas e são responsáveis pela regulação da transdução de sinal e no crescimento e proliferação celular (Lau & Zang, 2000; Dasari *et al.* 2001). A perda de expressão deste gene conduz à perda da transdução de sinal, fazendo com que haja

inibição ou estimulação contínua da célula, ou seja, esta perde a sua capacidade de regulação (Dasari *et al.* 2001). O gene *RBMY1D* codifica uma proteína de ligação ao RNA que está associada à espermatogénese. Um estudo em linhas celulares demonstrou que este gene poderá ser um novo oncogene do cromossoma Y (Tsuei *et al.* 2004).

Tal como foi referido anteriormente, verificou-se que as microvariações no *locus* DYS458 estavam sobre-representadas na amostra populacional de indivíduos com cancro da próstata. Estas microvariações, ou repetições incompletas (*deleções* ou *inserções*), podem ser devidas ao deslizamento da DNA polimerase aquando da replicação de DNA tal como observado por Suzuki aquando do estudo da instabilidade de STR em células de mamífero (Suzuki *et al.* 2001). O *locus* DYS458, já referido anteriormente, encontra-se na mesma região que o gene *TSPY*, sendo este o único gene funcional desta região (Vijayakumar *et al.* 2006), podendo funcionar como um oncogene (Lau, 1999). Este gene aumenta a proliferação celular *in vitro* e a tumorigénese *in vivo*, para além de mediar a transição do *checkpoint* G₂/M a uma velocidade maior do que a encontrada em células “normais” (Oram *et al.* 2006). O *checkpoint* celular G₂/M é responsável pela verificação de erros no DNA aquando da replicação, pois este encontra-se duplicado em vez de em cópia única tal como acontece em G₁ (Lewin, 2000). Tendo em conta o que foi referido anteriormente, nas células com expressão anormal de *TSPY*, tal como acontece com as de cancro da próstata, os erros na molécula de DNA que se formaram aquando da replicação da mesma podem não ser reparados como numa célula normal, na medida em que a transição do *checkpoint* G₂/M ocorre a um ritmo mais elevado do que o normal. Assim sendo, a rápida transição neste *checkpoint* pode ser responsável pelas microvariações encontradas em indivíduos com cancro da próstata.

5.2 Cromossoma X

Os resultados de vários estudos em indivíduos com cancro da próstata sugerem a localização de um *locus* no cromossoma X que confere susceptibilidade à doença, uma vez que indivíduos que têm um irmão com a doença apresentam um maior risco de a desenvolver, quando comparados com indivíduos que tenham um pai com a doença. Esta observação é consistente com a hipótese de transmissão hereditária de um gene ligado ao cromossoma X (Monroe *et al.* 1995).

Tal como para o cromossoma Y, a análise do cromossoma X teve como base a pesquisa de genes que possam estar em desequilíbrio de *linkage* com determinados *loci*, nomeadamente, com aqueles em que se verificou que certos alelos poderiam estar envolvidos na protecção para o desenvolvimento de cancro da próstata. O *locus* GATA172D05 encontra-se na região Xq23 (Figura 5), estando esta *deletada* em indivíduos que possuem tumores sólidos e mais recentemente foi descoberto que também se encontra *deletada* em indivíduos com leucemias mielóides (Wong *et al.* 2000). Do mesmo modo, nesta região podem encontrar-se genes que estejam envolvidos em mecanismos de desenvolvimento da patologia em questão.

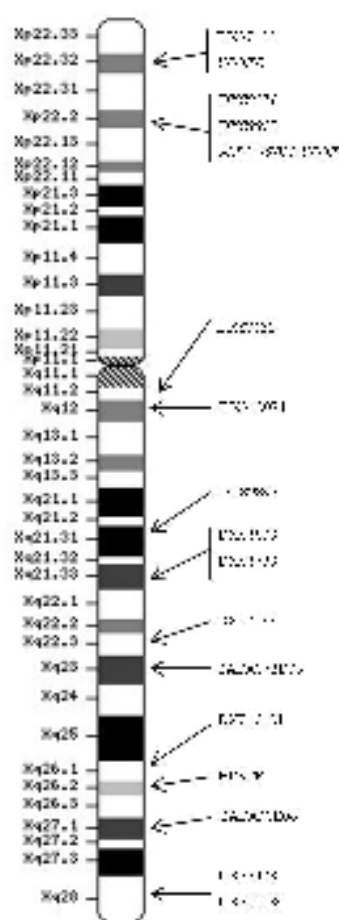


Figura 5 – Localização dos *loci* em estudo do cromossoma X e de genes que possam estar em desequilíbrio de *linkage* com eles.

Os *loci* DXS9902 e DXS8378 localizam-se na região Xp22.2 tal como o *locus* ASB9-ASB11-VEGFD (figura 5). O *locus* DXS10135 localiza-se na região Xp22.31 bem como o gene que codifica para a proteína VEGFD (*vascular endothelial growth factor D*) (figura 5). A VEGFD é uma proteína que pertence à família VEGF, estando estas

implicadas na remodelação vascular durante a embriogénese, para além de desempenharem um papel na carcinogénese. Esta proteína é o alvo do sistema de sinalização celular Wnt/ β -catenina (Katoh & Katoh, 2006). Recentemente vários autores demonstraram o papel desta via no desenvolvimento do cancro da próstata (Whitaker *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008). É de notar que apesar de o *locus* DXS8378 estar representado nos dois sistemas de amplificação de DNA (Argus X-8 e Decaplex), só foram obtidas diferenças estatisticamente significativas para as amostras amplificadas com o *kit* Argus X-8, uma vez que a amostra populacional controlo não é igual para os dois *multiplex* estudados. Tal como referido anteriormente para o *locus* DYS19, há que ter em conta que a contribuição de determinado marcador para o risco ou susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro da próstata está dependente da população em estudo, bem como de determinados factores ambientais e dietéticos a que a população está sujeita (Medeiros *et al.* 2004). É ainda de referir que os três *loci* supra-citados (DXS9902, DXS8378 e DXS10135) se localizam na mesma região de *linkage* do cromossoma X - região de *linkage* 1 (Szibor *et al.* 2003b). Sendo assim, era de esperar que se comportassem do mesmo modo, ou seja, que estivessem todos em desequilíbrio de *linkage* com genes que possam conduzir ao cancro da próstata, uma vez que são transmitidos em bloco. Para além de poderem estar em desequilíbrio de *linkage* com o gene *VEGFD*, já foi proposta a existência, nesta mesma região, de um gene supressor de tumores, que interaja com a via de carcinogénese relacionada com o gene *BRCA1*. Estas conclusões foram obtidas através de um estudo realizado em células de cancro dos ovários (Buekers *et al.* 2000). Um mecanismo semelhante poderá ocorrer no cancro da próstata, uma vez que já foi descrita a influência deste mesmo gene no desenvolvimento desta patologia. Indivíduos que possuem mutações no gene *BRCA1* têm um risco superior de desenvolverem cancro da próstata do que indivíduos que não possuam mutações neste gene (Simard *et al.* 2003; Gillanders *et al.* 2004; Shaid, 2004; Douglas *et al.* 2007; Cybulski *et al.* 2008; Mitra *et al.* 2008).

Resumidamente, os *loci* DYS458, DYS393, DYS389II, DYS635, DYS385, DYS448, GATA172D05, DXS9902, DXS8378 e DXS10135 podem estar em desequilíbrio de *linkage* com genes envolvidos no processo de tumorigénese do cancro da próstata (quadro 26), podendo assim alterar a expressão genética de um modo ainda não esclarecido. Os genes descritos anteriormente e que estão indicados no quadro

desempenham um papel fundamental no controlo do ciclo celular e na proliferação celular, excluindo-se apenas a proteína codificada pelo gene *BPY2*, cuja função ainda não é conhecida.

Quadro 26 - Possíveis genes que possam estar em desequilíbrio de *linkage* com os Y-STR e X-STR analisados neste trabalho.

<i>Locus</i>	Localização no cromossoma	Possível gene em desequilíbrio de <i>linkage</i>
DYS458 DYS393	Yp11.2	<i>TSPY</i>
DYS389II DYS635	Yq11.21	<i>USP9Y</i>
DYS385	Yq11.222	<i>EIF1AY; SMCY</i>
DYS448	Yq11.223	<i>RPS4YZ; RBMY1D; PRY; BPYZ; DAZ; CDY1</i>
GATA172D05	Xq23	?
DXS9902 DXS8378	Xp22.2	<i>ASB9-ASB11-VEGFD</i>
DXS10135	Xp22.31	<i>VEGFD</i>

A nível forense poderia discutir-se a continuação da utilização destes marcadores. No entanto, apesar de poderem estar em desequilíbrio de *linkage* com genes ligados ao desenvolvimento do cancro da próstata é de referir que aquando da comparação da distribuição alélica de cada *locus* entre as duas populações, não foram observadas diferenças significativas entre as mesmas, exceptuando-se apenas os *loci* DYS393 e DXS10135. Antes de questionar a existência destes *loci* em *kits* de âmbito forense deverão realizar-se mais estudos populacionais, de modo a poder-se estudar o comportamento dos mesmos perante outras amostras. Para além da análise geral dos diferentes *loci*, foram analisados individualmente alguns alelos, tal como referido ao longo dos resultados. Concluiu-se que alguns alelos poderão ser indicativos de maior ou menor susceptibilidade para o cancro da próstata. Quanto às dúvidas levantadas por esta observação há a reter que o cancro da próstata é uma doença multifactorial e a presença de um determinado alelo num *locus* específico indica uma probabilidade e não uma certeza absoluta. Para além disso, a maioria dos alelos observados são possíveis alelos protectores e não alelos de risco, não se levantando quaisquer questões éticas. Pelos motivos explanados anteriormente não parece que haja qualquer problema na continuação da utilização destes *loci* como marcadores forenses.

Para além dos resultados implicados na análise de *linkage* foram também observadas outras alterações que terão que ser discutidas, nomeadamente a observação de um novo alelo no *locus* DYS456, uma *deleção* no *locus* DYS448 e de microvariações nos *loci* DXS9902, DXS9898 e DXS7132.

Durante a realização deste trabalho foi observado um novo alelo para o *locus* DYS456 que foi confirmado por sequenciação. Uma vez que a sequência nucleotídica da amostra em causa é igual à da amostra padrão diferindo estas duas apenas no número de repetições pode-se afirmar que se está perante um novo alelo para este *locus*.

A amostra 4000 foi sequenciada para o *locus* DYS448, uma vez que não foi possível a sua amplificação pelo *kit* AmpF ℓ STR[®] Y-Filer[™] (Applied Biosystems). Questionou-se a existência de mutações no local de *annealing* dos *primers* e para a sua confirmação foram desenhados novos *primers* que emparelhassem noutra região e que estivessem mais afastados da sequência repetitiva. Mesmo com os novos *primers* não foi possível a amplificação deste *locus* na amostra em causa. Pode-se assim concluir que esta amostra possui uma *deleção* nesta mesma região, não tendo sido possível determinar a sua exacta localização e qual a sua extensão. Esta observação está de acordo com vários estudos realizados no cromossoma Y que demonstram a perda de material genético neste cromossoma durante o desenvolvimento de cancro da próstata (Perinchery *et al.* 2000; Jordan *et al.* 2001)

Algumas amostras foram sequenciadas para *loci* do cromossoma X, de modo a confirmar-se a existência de microvariações nas mesmas. As amostras sequenciadas para o *locus* DXS9902 revelaram a existência de uma inserção de uma adenina antes do motivo de repetição (Anexo III). Esta inserção fez com que as amostras fossem consideradas numa primeira fase como amostras com microvariações. Uma vez que as mesmas apresentavam um número inteiro de repetições a sua atribuição alélica foi corrigida.

As amostras sequenciadas para o *locus* DXS9898 revelaram que as mesmas possuíam um número incompleto de repetições, apesar de este ser diferente do que inicialmente se pensava. Esta divergência pode ser devida às diferenças de mobilidade das amostras nos capilares do sequenciador automático. Para além desta hipótese, há a ter em conta que a atribuição alélica destas amostras foi realizada por comparação com uma amostra de referência e não por comparação com um *ladder*. Como é de calcular, este método manual de atribuição alélica pode conduzir a erros o que poderão também explicar a diferença entre os resultados obtidos por comparação com uma amostra de

referência e os resultados obtidos após a sequenciação. A amostra 3781, para além de uma repetição incompleta possui ainda uma *deleção* de uma timina antes da sequência de repetição.

As amostras que foram sequenciadas para o *locus* DXS7132 não revelaram a presença de quaisquer motivos de repetições incompletos. As diferenças observadas entre a atribuição alélica obtida apenas por comparação com uma amostra de referência e a obtida após a sequenciação podem ser devidas aos mesmos factores expostos anteriormente para o *locus* DXS9898.

Ao contrário do que aconteceu para as microvariações observadas no cromossoma Y, as microvariações no *locus* DXS9898 e as inserções antes do motivo de repetição no *locus* DXS9902 parecem não estar envolvida no desenvolvimento do cancro da próstata, uma vez que as suas frequências são semelhante nas duas amostras populacionais analisadas (indivíduos “normais” vs indivíduos com cancro da próstata).

6 Conclusões e Perspectivas Futuras

1) Em face dos resultados obtidos relativamente aos STR é possível concluir que:

- Foi identificado um novo alelo no *locus* DYS456, o qual foi denominado de 11, por sequenciação e comparação com uma amostra de referência;
- Foi identificada uma *deleção* no *locus* DYS448, cuja extensão e localização não foi possível confirmar, não obstante de se ter usado um novo par de *primers*;
- Foram identificadas sete inserções e uma *deleção* no *locus* DYS458, três das quais na mesma posição;
- Foi identificada uma inserção de uma adenina antes da sequência de repetição no *locus* DXS9902 em cinco amostras;
- Foram identificados motivos de repetição incompletos no *locus* DXS9898 em sete amostras;
- Foi identificado uma amostra que possuía um motivo de repetição incompleto para o *locus* DXS9898 e a *deleção* de uma timina após esse motivo de repetição.

Os STR (mesmo os que são usados no âmbito da genética forense) são uma ferramenta útil para o *screening* do genoma humano aquando da pesquisa de genes que possam estar envolvidos no desenvolvimento de uma determinada patologia.

2) Relativamente aos resultados obtidos através da análise de frequências alélicas entre as diferentes amostras populacionais é possível concluir que:

- Os indivíduos portadores de um dos seguintes alelos: 12 (DYS393), 19 (DYS458), 27 (DYS389II), 25 (DYS635), 13 e 17 (DYS385), 21 (DYS448), 11 (DXS8378), 23 (DXS10135), 11 (GATA172D05) e 12 (DXS9902) apresentam menor risco de desenvolverem cancro da próstata quando comparados com indivíduos que não sejam portadores de um destes alelos;
- Os indivíduos portadores do alelo 13 (DYS393) apresentam um maior risco de desenvolverem cancro da próstata quando comparados com indivíduos que não sejam portadores deste alelo;
- Os *loci* DYS458 e DYS393 poderão estar em desequilíbrio de *linkage* com o gene *TSPY*;

- Os *loci* DYS389II e DYS635 poderão estar em desequilíbrio de *linkage* com o gene *USP9Y*;
- O *locus* DYS385 poderá estar em desequilíbrio de *linkage* com os genes *EIF1AY* e *SMCY*;
- O *locus* DYS448 poderá estar em desequilíbrio de *linkage* com os genes *RPS4YZ*, *RBMY1D*, *PRY*, *BPYZ*, *DAZ* e *CDY1*;
- Os *loci* DXS9902 e DXS8378 poderão estar em desequilíbrio de *linkage* com o *locus* *ASB9-ASB11-VEGFD*;
- O *locus* DXS10135 poderá estar em desequilíbrio de *linkage* com o gene *VEGFD*.

Neste trabalho propõem-se vários genes, tanto do cromossoma Y como do X, que possam estar envolvidos no desenvolvimento do cancro da próstata, uma vez que são genes importantes do ciclo e do crescimento celular. Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho efectuado até à data com estes marcadores na amostra populacional do Norte de Portugal. Deste modo, sugere-se que este estudo seja alargado numa primeira fase à restante população Portuguesa e numa fase posterior a outras populações. Para além destes estudos populacionais é necessário que sejam efectuados outros estudos, nomeadamente de expressão genética, a partir dos quais se possa tentar elucidar de que modo os genes aqui descritos influenciam o desenvolvimento da patologia em questão. É importante saber qual o comportamento celular quando os genes em causa estão sobre-expressos, sub-expressos ou mesmo *deletados*. Só deste modo é que se poderão propor mecanismos de actuação dos mesmos. Propõem-se ainda um outro estudo, em particular para o cromossoma Y, com os ascendentes e descendentes destes indivíduos (caso existam) de modo a verificar se possuem o mesmo haplótipo ou não, uma vez que variados cancros levam à instabilidade de STR, podendo o mesmo fenómeno ocorrer no cancro da próstata, nomeadamente para os *loci* que apresentam alelos de susceptibilidade ou de risco para o desenvolvimento da patologia em questão.

7 Referências Bibliográficas

- Alers J.C., Rochat J., Krijtenburg P.J., Hop W.C.J., Kranse R., Rosenberg C., Tanke H.J., Schoeder F.H., Dekken H. (2000). Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Laboratory Investigation*, Vol.80, No.6, 931-942
- Astolfi P., Bellizi D., Sgaramella V. (2003). Frequency and coverage of trinucleotide repeats in eukaryotes. *Gene*, 317:117-125
- Boby T., Patch A.M., Aves S.J. (2005). TRbase: a database relating tandem repeats to disease genes for the human genome. *Bioinformatics*, Vol.21, No.6, 811-816
- Bradford T.J., Tomlins S.A., Wang X., Chinnaiyan A.M. (2006). Molecular markers of prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 24: 538-551
- Buekers T.E., Lallas T.A., Buller R.E. (2000). Xp22.2-3 Loss of Heterozygosity Is Associated with Germline BRCA1 Mutation in Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology*, 76: 418-422
- Burger M., Denzinger S., Hammerschmied C.G., Tannapfel A., Obermann E.C., Wieland W.F., Hartmann A., Stoehr R. (2006). Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides (EMAST) and mismatch repair gene expression in prostate cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 84: 833-841
- Butler J.M. (2003). Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Forensic Science Review*, 15: 91-111.
- Butler J.M. (2005a). Forensic Issues: degraded DNA, PCR inhibition, contamination, mixed samples and low copy number. In: *Forensic DNA typing*. Elsevier Academic
- Butler J.M. (2005b). Biology of STRs: stutter products, non-template addition, microvariants, null alleles and mutation rates. In: *Forensic DNA typing*. Elsevier Academic
- Butler J.M. (2006). Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. *Journal of Forensic Sciences*, Vol.51, No.2, 253-265
- Costa S., Pinto D., Morais A., Vasconcelos A., Oliveira J., Lopes C., Medeiros R. (2004). Acetylation Genotype and the Genetic Susceptibility to Prostate Cancer in a Southern European Population, *The Prostate*, 64: 246-252
- Cybulski C., Górski B., Gronwald J., Huzarski T., Byrski T., Debniak T., Jakubowska A., Wokolorczyk D., Gliniewicz B., Sikorski A., Stawicka M., Godlewski D., Kwias

- Z., Antczak A., Krajka K., Lauer W., Sosnowski M., Sikorska-Radek P., Bar K., Klijer R., Romuald Z., Malkiewicz B., Borkowski A., Borkowski T., Szwiec M., Posmyk M., Narod S.A., Lubiński J. (2008). BRCA1 mutations and prostate cancer in Poland. *European Journal of Cancer Prevention*, 17: 62-66
- Dasari V.K., Goharderakhshan R.Z., Perinchery G., Li L.C., Tanaka Y., Alonzo J., Dahiya R. (2001). Expression analysis of Y chromosome genes in human prostate cancer. *The Journal of Urology*, Vol.165, 1335-1341
- Deng S., Zhou H., Xiong R., Lu Y., Yan D., Xing T., Dong L., Tang E., Yang H. (2007). Over-expression of genes and protein ubiquitin specific peptidases (USPs) and proteasome subunits (PSs) in breast cancer tissue observed by the methods of RFDD-PCR and proteomics. *Breast Cancer Res Treat*, 104: 21-30
- Dong J.T. (2006). Prevalent Mutations in Prostate Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97: 433-447
- Santos M.L. dos, Sarkis A.S., Nishimoto I.N., Nagai M.A. (2003). Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. *Cancer Detection and Prevention*, 27:321-326
- Douglas J.A., Levin A.M., Zuhlke K.A., Ray A.M., Johnson G.R., Lange E.M., Wood D.P., Cooney K.A. (2007). Common Variation in the BRCA1 Gene and Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16 (7): 1510-1516
- Ellegren H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews: Genetics*, Vol.5, 435-445
- Erbersdobler A., Bardenhagen P., Henke R.P. (1999). Numerical Chromosomal anomalies in latent adenocarcinomas of the prostate. *The Prostate* 38:92-99
- Ewis A.A., Lee J., Naroda T., Sasahara K., Sano T., Kagawa S., Iwamoto T., Nakahori Y. (2002). Linkage between prostate cancer incidence and different alleles of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19. *Journal of Medical Investigation*, 49(1-2), 56-60
- Gaikwad S., Ashma R., Kumar N., Trivedi R., Kashyap V.K. (2005). Host microsatellite alleles in malaria predisposition? *Malaria Journal*, 4:50-54
- Gillanders E.M., Xu J., Chang B., Lange E.M., Wiklund F., Bailey-Wilson J.E., Baffoe-Bonnie A., Jones M.P., Gildea D., Riedesel E., Albertus J., Isaacs S.D., Wiley K.E., Mohai C.E., Matikainen M.P., Tammela T.L.J., Zheng S.L., Brown W.M., Rokman A., Carpten J.D., Meyers D.A., Walsh P.C., Schleutker J., Gronberg H., Cooney K.A., Isaacs W.B., Trent J.M. (2004). Combined Genome-Wide Scan for Prostate

- Cancer Susceptibility Genes. Journal of the National Cancer Institute, Vol.96, No. 16, 1240-1247
- Graves J.A.M., Gécz J., Hameisterd H. (2002). Evolution of the human X – a smart and sexy chromosome that controls speciation and development. Cytogenetic and Genome Research, 99:141–145
- Gu Y., Kim K.H., Ko D., Nakamura K., Yasunaga Y., Moul J.W., Srivastava S., Arnstein P., Rhim J.S. (2004). A telomerase-immortalized primary human prostate cancer clonal cell line with neoplastic phenotypes. International Journal of Oncology, 25: 1057-1064
- Hanson E.K., Ballantyne J. (2006). Comprehensive annotated STR physical map of the human Y chromosome: Forensic implications. Legal Medicine 8: 110–120
- Jacewicz R., Szram S., Galecki P., Berent J. (2006). Will genetic polymorphism of tetranucleotide sequences help in the diagnostics of major psychiatric disorders? Forensic Science International, 162: 24-27
- Jordan J.J., Hanlon A.L., Al-Saleem T.I., Greenberg R.E., Tricoli J.V. (2001). Loss of the short arm of the Y chromosome in human prostate carcinoma. Cancer Genetics and Cytogenetics, 124:122-126
- Katoh Y., Katoh M. (2006). Comparative integromics on VEGF family members. International Journal of Oncology, 28: 1585-1589.
- Kimpton C., Gill P., D'Aloja E., Andersen J.F., Bar W., Holgersson S., Jacobsen S., Johnson V., Kloosterman A.D., Lareu M.V., Nellemann L., Pfitzinger K., Phillips C.P., Rand S., Schmitter H., Schneider H., Sternersen M., Vide M.C. (1995). Report on the second EDNAP collaborative STR exercise. Forensic Science International, 71:137-152
- Knobloch R., Konrad L., Barth P.J., Brandt H., Wille S., Heidenreich A., Moll R., Hofmann R. (2004). Genetic Pathways and New Progression Markers for Prostate Cancer Suggested by Microsatellite Allelotyping. Clinical Cancer Research, Vol.10, 1064-1073
- Konig J.J., Teubel W., Romijn J.C., Schroeder F.H., Hagemeijer A. (1996). Gain and Loss of Chromosomes 1, 7, 8, 10, 18 and Y in 46 Prostate Cancers. Human Pathology, Vol. 27, No. 7, 720-727
- Krausz C., Quintana-Murci L., Forti G. (2004). Y chromosome polymorphisms in medicine. Annals of Medicine, 36: 573-583

- Lau Y.F.C. (1999). Gonadoblastoma, Testicular and Prostate Cancers, and the TSPY Gene. *Am. J. Hum. Genet*, 64:921-927
- Lau Y.F.C., Lau H.W., Kömüves L.G. (2003). Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenetic and Genome Research*, 101: 250-260
- Lau Y.F.C., Zhang J. (2000). Expression Analysis of Thirty One Y Chromosome Genes in Human Prostate Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 27: 308-321
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982). Extraction of Bacteriophage λ DNA. In: *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory
- Medeiros R., Morais A., Vasconcelos A., Costa S., Pinto D., Oliveira J., Carvalho R., Lopes C. (2002a). Linkage between Polymorphisms in the Prostate Specific Antigen ARE1 Gene Region, Prostate Cancer Risk, and Circulating Tumor Cells. *The Prostate*, 53: 88-94
- Medeiros R., Morais A., Vasconcelos A., Costa S., Pinto D., Oliveira J., Carvalho R., Lopes C. (2002b). The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the susceptibility to prostate cancer of a southern European population. *Journal of Human Genetics*, 47: 413-418
- Medeiros R., Vasconcelos A., Costa S., Pinto D., Ferreira P., Lobo F., Morais A., Oliveira J., Lopes C. (2004). Metabolic Susceptibility Genes and Prostate Cancer Risk in a Southern European Population: The Role of Glutathione S-Transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 Genetic Polymorphisms. *The Prostate*, 58: 414-420
- Medeiros R., Vasconcelos A., Costa S., Pinto D., Morais A., Oliveira J., Lopes C. (2003). Steroid hormone genotypes ARStuI and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 141: 91-96
- Miller A.S., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16 (3), 1215
- Mishra D.K., Thangaraj K., Mandhani A., Kumar A., Mittal R.D. (2005). Is reduced CAG repeat length in androgen receptor gene associated with risk of prostate cancer in Indian population? *Clinical Genetics*, 68: 55-60
- Mitra A., Fisher C., Foster C.S., Jameson C., Barbachanno Y., Bartlett J., Bancroft E., Doherty R., Kote-Jarai Z., Peock S., Easton D., IMPACT and EMBRACE Collaborators, Eeles R. (2008). Prostate Cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. *British Journal of Cancer*, 98: 502-507

- Monroe K.R., Yu M.C., Kolonel L.N., Coetzee G.A., Wilkens L.R., Ross R.K., Henderson B.E. (1995). Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nature Medicine*, 1, 827-829
- Morgan N.V., Gissen P., Sharif S.M., Baumber L., Sutherland J., Kelly D.A., Aminu K., Bennet C.P., Woods C.G., Mueller R.F., Trembath R.C., Maher E.R., Johnson C.A. (2002). A novel locus for Meckel-Gruber syndrome, *MSK3*, maps to chromosome 8q24. *Human Genetics*, 111:456-461
- Nupponen N.N., Carpten J.D. (2001). Prostate cancer susceptibility genes: Many studies, many results, no answers. *Cancer and Metastasis reviews* 20:155-164
- Nwosu V., Carpten J., Trent J., Sheridan R. (2001). Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Human molecular genetics*, Vol.10, No.20, 2313-2318
- Paracchini S., Pearce C.L., Kolonel L.N., Altshuler D., Henderson B.E., Tyler-Smith C. (2003). A Y chromosomal influence on prostate cancer risk: the multi-ethnic cohort study. *Journal of Medical Genetics*, 40:815-819
- Perinchery G., Saski M., Angan A., Kumar V., Carrol P., Dahiya R. (2000). Deletion of Y Chromosome Specific Genes in Human Prostate Cancer. *The Journal of Urology*, Vol.163, 1339-1342
- Petros J.A., Baumann A.K., Ruiz-Pesini E., Amin M.B., Sun C.Q., Hall J., Lim S.D., Issa M.M., Flanders W.D., Hosseini S.H., Marshall F.F., Wallace D.C. (2005). mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *PNAS*, vol.102, no.3, 719–724
- Pinheiro P.S., Tyczynski J.E., Bray F., Amado J., Matos E., Parkin D.M. (2003). Cancer incidence and mortality in Portugal. *European Journal of Cancer*, 39:2507-2520
- Pontes M.L., Cainé L., Abrantes D., Lima G., Pinheiro M.F. (2007) Allele frequencies and population data for 17 Y-STR loci (*AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Y-Filer TM*) in a Northern Portuguese population sample. *Forensic Sci Int.*, Jul 20;170(1):62-7
- Porkka K.P., Visakorpi T. (2004). Molecular Mechanisms of Prostate Cancer. *European Urology*, 45: 683-691
- Rajender S., Singh L., Thangaraj K. (2007). Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian Journal of Andrology*, Vol.9, No2, 147-179
- Regateiro F.J. (2007a). *Manual de Genética Médica*. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 135

- Regateiro F.J. (2007b). Manual de Genética Médica. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 68-70
- Ribeiro R., Vasconcelos A., Costa S., Pinto D., Morais A., Oliveira J., Lobo F., Lopes C., Medeiros R. (2004). Overexpressing Leptin Genetic Polymorphism (-2548 G/A) Is Associated With Susceptibility to Prostate Cancer and Risk of Advanced Disease. *The Prostate*, 59: 268-274
- Riley D.E., Cho I.R., Krieger J.N. (1999). A hemizygous short tandem repeat polymorphism 3' to the human phosphoglycerate kinase gene. *Molecular Biology Reports*, 26: 159-165
- Riley D.E., Krieger J.N. (2001). Short tandem repeat polymorphism linkage to the androgen receptor gene in prostate carcinoma. *Cancer*, Vol.92, No.10, 2603-2608
- Riley D.E., Krieger J.N. (2005). Short tandem repeat (STR) replacements in UTR and introns suggest an important role for certain STRs in gene expression and disease. *Gene*, 344: 203-211
- Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., Frankish A., Lovell F.L., Howe K.L., Ashurst J.L., Fulton R.S., Sudbrak R., Wen G., Jones M.C., Hurles M.E., Andrews T.D., Scott C.E., Searle S., Ramser J., Whittaker A., Deadman R., Carter N.P., Hunt S.E., Chen R., Cree A., Gunaratne P., Havlak P., Hodgson A., Metzker M.L., Richards S., Scott G., Steffen D., Sodergren E., Wheeler D.A., Worley K.C., Ainscough R., Ambrose K.D., Ansari-Lari M.A., Aradhya S., Ashwell R.I.S., Babbage A.K., Bagguley C.L., Ballabio A., Banerjee R., Barker G.E., Barlow K.F., Barrett I.P., Bates K.N., Beare D.M., Beasley H., Beasley O., Beck A., Bethel G., Blechschmidt K., Brady N., Bray-Allen S., Bridgeman A.M., Brown A.J., Brown M.J., Bonnin D., Bruford E.A., Buhay C., Burch P., Burford D., Burgess J. et al. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, Vol.434, 325-337
- Rubin M.A., De Marzo A.M. (2004) Molecular genetics of human prostate cancer. *Modern Pathology*, 17: 380-388
- Sattler H.P., Rohde V., Bonkhoff H., Zwergel T., Wullich B. (1999). Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *The Prostate*, 39:79-86
- Schafnner S.F. (2004). The X chromosome in Population Genetics. *Nature Reviews: genetics*. Vol.5, 43-51

- Schaid D.J. (2004). The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human Molecular Genetics*, Vol.13, Review Issue 1, R103-R121
- Schultz W.A., Burchardt M., Cronauer M.V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction*, Vol.9, No.8, 437-448
- Sharma P., Hingorani A., Jia H., Ashby M., Hopper R., Clayton D., Brown M.J. (1998). Positive association of tyrosine hydroxylase microsatellite marker to essential hypertension. *Hypertension*, 32:676-682
- Simard J., Dumont M., Labuda D., Sinnett D., Meloche C., El-Alfy M., Berger L., Lees E., Labrie F., Tavtigian S.V. (2003). Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *Endocrine Related Cancer*, 10:225-259
- Spatz A., Borg C., Feunteun J. (2004). X-chromosome genomics and human cancer. *Nature Reviews: cancer*. Vol.4, 617-629
- Stephan D.A., Howell G.R., Teslovich T.M., Coffey A.J., Smith L., Bailey-Wilson J.E., Malecheck L., Gildea D., Smith J.R., Gillanders E.M., Schleutker J., Hu P., Steinberg H.E., Dhami P., Robbins C.M., Makalowska I., Carpten J.D., Sood R., Mumm S., Reinbold R., Bonner T.I., Baffoe-Bonnie A., Budendorf L., Heiskanen M., Kallioneimi O.P., Baxevanis A.D., Joseph S.S., Zucchi I., Burk R.D., Isaacs W., Ross M.T., Trent J.M. (2002). Physical and transcript map of the hereditary prostate cancer region Xq27. *Genomics*, Vol.79, No.1, 41-50
- Szibor R., Edelmann J., Hering S., Plate I., Witting H., Roewer L., Wiegand P., Cali F., Romano V., Michael M. (2003a). Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Science International*, 138: 37-43
- Szibor R., Hering S., Edelmann J. (2005). The HumARA genotype is linked to spinal and bulbar muscular dystrophy and some further disease risks and should no longer be used as a DNA marker for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*, 119: 179-180
- Szibor R., Krawezak M., Hering S., Edelman J., Kuhlish E., Krause D. (2003b). Use of X-linked markers for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*, 117: 67-74
- Tamaki K., Jeffreys A.J. (2005). Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Medicine*, 7: 244-250
- Thibaut F., Ribeyre J.M., Dourmap N., Meloni R., Laurent C., Campion D., Ménard J.F., Dollfus S., Mallet J., Petit M. (1997). Association of DNA polymorphism in

- the first intron of the tyrosine hydroxylase gene with disturbances of the catecholaminergic system in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 23:259-264
- Tie J., Serizawa Y., Oshida S., Usami R., Yoshida Y. (2006). Short Tandem Repeat Polymorphism in the Flanking Region of the Human Phosphoglycerate Kinase Gene in a Japanese Population. *Human Biology*, Vol.78, No.2, 243-247
- Tran N., Bharaj B.S., Diamandis E.P., Smith M., Li B.D.L., Yu H. (2004). Short tandem repeat polymorphism and cancer risk: influence of laboratory analysis on epidemiologic findings. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 13(12):2133-2140
- Tsuei D.J., Hsu H.C., Lee P.H., Jeng Y.M., Pu Y.S., Chen C.N., Lee Y.C., Chou W.C., Chang C.J., Ni Y.H., Chang M.H. (2004). RMBY, a male germ cell-specific RNA-binding protein, activated in human liver cancers and transforms rodent fibroblasts. *Oncogene*, 23(34): 5815-5822
- Vauhkonen H., Hedman M., Vauhkonen M., Kataja M., Sipponen P., Sajantila A. (2004). Evaluation of gastrointestinal tissues as a source of genetic information for forensic investigations by using STRs. *Forensic Science International*, 139:159-167
- Vauhkonen H., Vauhkonen M., Sipponen P., Sajantila A. (2004). Correlation between the allelic distribution of STRs in a Finnish population and phenotypically different gastrointestinal tumours: a study using four X-chromosomal markers (DXS7423, DXS8377, ARA, DXS101). *Annals of Human Genetics*, 68:555-562
- Vijayakumar S., Garcia D., Hensel C.H., Banerjee M., Bracht T., Xiang R., Kagan J., Naylor S.L. (2005). The human Y chromosome suppresses the tumorigenicity of PC-3, a human prostate cancer cell line, in athymic nude mice. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 44: 365-372
- Vijayakumar S., Hall D.C., Reveles X.T., Troyer D.A., Thompson I.M., Garcia D., Xiang R.H., Leach R.J., Johnson-Pais T.L., Naylor S.L. (2006). Detection of Recurrent Copy Number Loss at Yp11.2 Involving TSPY Gene Cluster in Prostate Cancer Using Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Research*, 66: 4055-4064
- Wang B.E., Wang X.D., Ernst J.A., Polakis P., Gao W.Q. (2008). Regulation of Epithelial Branching Morphogenesis and Cancer Cell Growth of the Prostate by Wnt Signaling. *PLoS ONE*, Vol.3, Issue 5, e2186

- Whitaker H.C., Girling J., Warren A.Y., Leung H., Mills I.G., Neal D.E. (2008). Alterations in β -Catenin Expression and Localization in Prostate Cancer. *The Prostate*, 68: 1196-1205
- Wong K.F., Siu L.L.P., So C.C. (2000). Deletion of Xq23 is a recurrent karyotypic abnormality in acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 122: 33-36
- Xu J., Meyers D., Freije D., Isaacs S., Wiley K., Nusskern D., Ewing C., Wilkens E., Bujnovszky P., Bova G.S., Walsh P., Isaacs W., Schleutker J., Matikainen M., Tammela T., Visakorpi T., Kallioniemi O.P., Berry R., Schaid D., French A., McDonnell S., Schroeder J., Blute M., Thibodeau S., Gronberg H., Emanuelson M., Damber J.E., Bergh A., Jonsson B.A., Smith J., Bailey-Wilson J., Carpten J., Stephan D., Gillanders E., Amundson I., Kainu T., Freas-Lutz D., Baffoe-Bonnie A., Aucken A.V., Sood R., Collins F., Brownstein M., Trent J. (1998). Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nature genetics* Vol.20, 175-179
- Yoon H.R., Park Y.S., Kim Y.K. (2002). Rapid Prenatal detection of Down and Edwards syndromes by fluorescent polymerase chain reaction with short tandem repeats markers. *Yonsei Medical Journal*, Vol.43, No.5, 557-566

Anexo I – Protocolos laboratoriais

Método modificado de extracção com fenol-clorofórmio

- Cortar a ponta da zaragatoa bucal seca para um *eppendorf*;
- Adicionar 500µL de solução de extracção (94% (v/v) tampão de extracção (10mM Tris pH 8; 10mM EDTA; 0,1M NaCl; 2% SDS); 4% (v/v) DTT 1M; 2% Proteinase K 10ng/mL);
- Agitar o *eppendorf* em vortex;
- Incubar em banho termostático, com agitação ligeira, a 56°C durante 3h;
- Recuperar a solução de lise pelo método de “*los dos viales*”:
 - Furar o fundo do tubo e a tampa do *eppendorf* que contém a amostra com uma agulha estéril (ou aquecida à chama);
- Introduzir este *eppendorf* num *eppendorf* limpo;
- Centrifugar durante 10min a 7697g;
- Adicionar 200µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) (USB Corporation) à solução de lise;
- Agitar;
- Centrifugar durante 3min a 16060g;
- Concentrar o DNA usando Microcon[®] Ultracel YM-100 (Millipore):
 - Colocar o filtro num *eppendorf* apropriado (ambos fornecidos com o *kit*);
 - Adicionar 100µL de água desionizada e esterilizada ao filtro do Microcon;
 - Recolher 400µL da fase posterior da amostra e adicionar ao mesmo filtro;
 - Centrifugar durante 20min a 973g;
 - Rejeitar o líquido do tubo;
 - Adicionar 200µL de água desionizada e esterilizada e centrifugar durante 30min a 973g;
 - Rejeitar o tubo com água;
 - Colocar o filtro invertido num novo tubo (fornecido pelo *kit*):
 - Adicionar 50µL de água desionizada e esterilizada morna e centrifugar durante 10min a 973g;
 - Retirar o filtro e armazenar a amostra.

Amplificação de DNA

AmpFℓSTR® Yfiler™ (Applied Biosystems)

- Preparar a *mix* de amplificação consoante o número de amostras sendo que o volume de cada componente para uma reacção é o seguinte:

- AmpFℓSTR Yfiler Kit PCR Reaction Mix	4,6μL
- AmpFℓSTR Yfiler Kit Primer Set	2,5μL
- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	0,4μL
- Água	4,5μL

Nota: incluir reacções adicionais nos cálculos uma vez que ocorrem sempre perdas de reagente aquando da distribuição da *mix*.

- Distribuir 11,5μL da *mix* por cada tubo de amplificação;
- Adicionar a cada tubo de amplificação 1μL de DNA (não quantificado);
- Amplificar no termociclador (Gold-plated silver block GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)) usando as condições de amplificação descritas no *kit*:

- 95°C	11min	} 30 ciclos
- 94°C	1min	
- 61°C	1min	
- 72°C	1min	
- 60°C	80min	
- 4°C	∞	

Todas as amplificações foram acompanhadas de um controlo positivo - 007 (Applied Biosystems) – e de um controlo negativo – água ou amostra 9947A (Applied Biosystems).

Argus X-8 (Mentype®)

- Preparar a amplificação de acordo com as instruções fornecidas com o *kit* de amplificação:

- Agitar todos os tubos fornecidos em vórtex;
- Preparar a *mix* de amplificação consoante o número de amostras sendo que o volume de cada componente para uma reacção é o seguinte:

- Água	7,6μL
- Reaction Mix B	2,5μL
- Primer Pair Mix	1,25μL
- Taq DNA polymerase (hot start, 2,5U/μL)	0,2μL

Nota: incluir reacções adicionais nos cálculos uma vez que ocorrem sempre perdas de reagente aquando da distribuição da *mix*.

- Distribuir 11,5μL da *mix* preparada anteriormente em cada um dos tubos de amplificação;
- Adicionar a cada tubo de amplificação 1μL de DNA (não quantificado);
- Amplificar no termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)) usando as condições de amplificação descritas no *kit*:

- 94°C	4min	
- 94°C	30s	} 30 ciclos
- 58°C	120s	
- 72°C	75s	
- 68°C	60min	
- 10°C	∞	

Todas as amplificações foram acompanhadas de um controlo positivo - XY1 (Mentype®) – e de um controlo negativo – água.

Decaplex

- Agitar todos os tubos fornecidos em vortex;
- Preparar a *mix* de amplificação consoante o número de amostras sendo que o volume de cada componente para uma reacção é o seguinte:

- Água	1,75μL
- 2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	6,25μL
- Q-Solution, 5x	1,25μL
- Primer Mix 10x	1,25L

Nota: incluir reacções adicionais nos cálculos uma vez que ocorrem sempre perdas de reagente aquando da distribuição da *mix*.

- Distribuir 12μL da *mix* preparada anteriormente em cada um dos tubos de amplificação;

- Adicionar a cada tubo de amplificação 0,5µL de DNA (não quantificado);
- Amplificar no termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)) usando as condições de amplificação descritas pelo GEP-ISFG:

- 95°C	15min	
- 94°C	30s	} 10 ciclos
- 60°C	90s	
- 72°C	60s	
- 94°C	30s	} 20 ciclos
- 58°C	90s	
- 72°C	60s	
- 60°C	60min	
- 4°C	∞	

Todas as amplificações foram acompanhadas de um controlo positivo – 9947A (Applied Biosystems) – e de um controlo negativo – água.

Sequenciação

Amplificação inicial de sequenciação

- Preparar a *mix* de amplificação consoante o número de amostras sendo que o volume de cada componente para uma reacção é o seguinte:

- Água	6,5µL
- 2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12,5µL
- Q-Solution, 5x	2,5µL
- Primer Mix 10x	2,5µL

Nota: incluir reacções adicionais nos cálculos uma vez que ocorrem sempre perdas de reagente aquando da distribuição da *mix*.

- Distribuir 24µL da *mix* preparada anteriormente em cada um dos tubos de amplificação;
- Adicionar a cada tubo de amplificação 1µL de DNA (não quantificado);
- Amplificar no termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)) usando as condições de amplificação optimizadas:

- 95°C	15min		
- 94°C	30s	}	30 ciclos
- 60°C	90s		
- 72°C	60s		
- 72°C	10min		
- 4°C	∞		

Nota: a temperatura de *annealing* dos *primers* durante a reacção de PCR está dependente do *locus* a analisar, tal como indicado no quadro 8.

Purificação com MinElute[®] PCR Purification Kit (Qiagen)

- Marcar as colunas fornecidas pelo *kit*;
- Marcar o mesmo número de *eppendorfs* de 1,5mL e descontaminar;
- Adicionar 5 volumes de tampão PB (fornecido) a 1 volume da reacção de PCR.

No caso deste trabalho, adicionar 125µL de tampão PB;

- Transferir todo o volume para a coluna e descartar o tubo usado na amplificação;
- Centrifugar durante 1min a 10000g;
- Descartar o que fica no tubo fornecido com o *kit*;
- Adicionar 750µL de tampão PE (fornecido) à coluna;
- Centrifugar durante 1min a 10000g;
- Descartar novamente o que fica no tubo fornecido com o *kit*;
- Centrifugar durante 1min a 10000g;
- Colocar a coluna num *eppendorf* previamente descontaminado;
- Adicionar 15µL de tampão EB (fornecido) ao centro da membrana existente em

cada coluna;

- Aguardar 1min à temperatura ambiente;
- Centrifugar durante 1min a 10000g;
- Descartar a coluna e guardar o *eppendorf* com a amostra amplificada e

purificada.

Amplificação de sequenciação

Para cada amostra fazer duas amplificações distintas (uma delas com *primer forward* e outra com *primer reverse*);

- Preparar a *mix* de amplificação consoante o número de amostras sendo que o volume de cada componente para uma reacção é o seguinte:

- Água	5,75µL
- BigDye Sequencing Buffer 5x	0,75µL
- Ready Reaction PreMix 2,5x	1,5µL
- Primer 3,2pmol/µL	1µL

Nota: incluir reacções adicionais nos cálculos uma vez que ocorrem sempre perdas de reagente aquando da distribuição da *mix*.

- Distribuir 9µL da *mix* preparada anteriormente em cada um dos tubos de amplificação,

- A cada tubo de amplificação adicionar 1µL de amostra amplificada e purificada com MinElute;

- Amplificar no termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)) usando as condições de amplificação descritas no *kit*:

- 96°C	1min	}	25 ciclos
- 96°C	10s		
- 50°C	5s		
- 60°C	4min		
- 4°C	∞		

Remoção dos terminadores com DyeEx 2.0 (Qiagen)

- Marcar a tampa da coluna e o tubo de 2mL fornecido pelo *kit* (não descontaminar);

- Marcar o mesmo número de *ependorfs* de 1,5mL e descontaminar;

- Agitar em vórtex a coluna;

- Rodar a tampa (¼ volta) da coluna;

- Cortar o fundo da coluna e colocar a mesma no tubo de 2mL;

- Centrifugar durante 3min a 750g;

- Descartar o tubo de 2mL e colocar a coluna num *eppendorf* limpo e previamente descontaminado;
- Aplicar todo o volume de amostra sequenciada na coluna com o cuidado de não tocar na mesma;
- Centrifugar durante 3min a 750g;
- Descartar a coluna e guardar os *eppendorfs* com a amostra purificada;
- Adicionar 16µL de Hi-Di™ Formamida – Genetic Analysis Grade (Applied Biosystems) a cada *eppendorf*;
- Transferir todo o volume para a placa de sequenciação;
- Colocar a placa no sequenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems);
- Iniciar a sequenciação.

Anexo II – Resultados

Haplótipos de 16 Y-STR (AmpF ℓ STR[®] Yfiler[™]) de indivíduos com cancro da próstata

Amostra	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	YGATA H4	DYS437	DYS438	DYS448
3566	14	13	23	29	14	15	13,13	12	11	12	21	11	12	15	9	21
3567	16	14	24	30	16	14	11,15	12	11	12	23	13	12	15	12	19
3568	16	13	24	29	172	15	14,16	12	9	11	21	11	10	14	10	20
3569	15	13	24	29	17	14	11,14	13	11	11	23	13	11	14	12	19
3570	16	13	23	30	19	15	11,15	13	11	11	23	13	12	14	12	19
3571	15	14	24	30	17	13	14,14	13	9	10	21	11	12	14	10	20
3577	15	12	24	28	18	14	11,14	13	11	13	23	13	11	15	12	20
3578	17	13	23	29	17	14	12,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3579	15	14	23	30	15	14	16,19	12	10	12	22	15	11	16	10	19
3580	17	14	23	30	17	14	11,13	13	11	12	24	13	12	15	12	19
3581	13	14	22	32	19	15	13,14	14	10	13	21	11	11	16	10	21
3582	15	13	24	29	17	13	11,14	14	11	12	23	13	11	14	12	19
3583	15	14	22	30	14	13	13,15	14	10	12	21	13	12	15	9	19
3584	16	12	22	28	15	14	13,15	13	10	11	22	11	11	16	10	20
3596	15	13	22	30	16	14	13,15	12	10	11	23	11	10	15	9	21
3597	13	12	24	28	15	15	13,16	12	10	12	22	11	10	16	9	19
3598	16	13	24	31	15	14	11,14	13	12	12	23	13	12	14	12	19
3599	16	13	24	29	16	14	12,13	13	11	12	23	13	11	15	12	19
3600	15	13	24	30	16	14	16,17	13	9	13	22	11	12	14	10	19
3601	15	13	23	29	17	14	11,15	13	10	12	24	14	12	15	12	19
3602	14	12	23	29	15	14	14,14	13	10	12	22	11	11	16	10	20
3603	16	13	23	29	14	15	13,16	13	9	12	21	11	12	14	8	21
3604	17	13	24	31	15	15	18,18	13	10	11	20	11	12	14	10	20
3605	15	14	26	30	17	15	12,15	13	11	12	23	13	12	16	12	20
3606	14	14	25	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3607	16	13	24	29	16	14	11,15	13	11	12	24	13	12	15	12	19
3608	17	13	24	29	18	14	11,14	13	10	11	23	13	12	14	12	18
3609	11	13	25	29	17	15	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3610	15	13	24	31	18	14	15,16	13	11	13	23	11	11	14	10	19
3611	17	14	24	30	17	13	13,14	13	10	9	23	11	12	14	10	19
3612	17	13	24	30	17	14	11,13	13	10	11	23	13	12	15	12	19
3613	15	13	24	29	16	14	11,14	13	11	13	23	13	12	15	12	19
3614	15	13	24	29	15	14	12,14	14	11	11	24	13	12	15	12	19
3615	16	13	24	28	18	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	11	19
3616	15	14	24	30	18	14	13,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3617	17	14	24	31	18	14	11,14	13	11	12	24	13	12	15	12	19
3618	15	14	24	30	17	14	11,14	13	10	13	23	13	12	14	12	19
3619	15	12	22	28	15	15	15,16	14	10	10	20	12	11	16	11	20
3636	15	12	21	29	17	15	13,15	13	10	11	23	11	11	16	10	22
3637	15	13	23	29	20	15	12,16	13	11	14	23	13	11	14	12	18
3638	15	14	23	31	20	14	13,15	12	10	11	20	11	11	14	10	20

Continua

Amostra	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	YGATA H4	DYS437	DYS438	DYS448
3639	17	13	24	30	17	13	16,19	13	10	12	22	11	12	14	10	20
3640	15	14	24	30	17	13	13,14	13	9	10	21	11	12	14	10	20
3641	16	13	24	30	19	15	11,14	13	10	12	23	13	11	15	12	19
3642	16	14	24	30	17	14	11,14	13	11	14	24	13	11	15	12	20
3643	15	13	24	32	16	13	11,16	13	11	12	23	11	11	14	10	19
3644	16	13	24	29	17	14	11,14	13	11	12	24	13	12	15	12	19
3645	15	13	24	29	17	14	12,14	13	10	13	23	13	12	15	12	20
3646	14	12	24	28	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3647	15	13	24	29	17	15	11,15	13	10	12	23	13	12	14	12	18
3648	15	13	24	29	17	14	11,17	13	10	12	23	13	13	14	12	19
3649	15	13	24	29	16	15	11,14	13	11	11	23	13	12	14	12	19
3650	15	14	24	30	19	13	13,15	13	9	10	21	11	12	14	10	20
3651	15	13	24	29	17	14	11,14	13	11	12	23	14	12	15	12	19
3652	15	12	24	29	16	13	16,18	13	11	10	23	11	11	14	10	20
3653	16	13	23	29	15	16	14,15	14	11	11	21	12	11	15	10	20
3696	15	12	23	28	16	14	11,14	13	13	12	23	13	12	15	12	19
3697	17	12	23	28	17	15	11,14	13	10	13	23	13	12	16	12	19
3698	17	14	24	31	18	13	16,17	12	10	12	21	11	11	14	10	20
3699	16	14	24	30	17	14	12,13	13	10	12	23	14	12	15	12	19
3700	15	12	24	28	16	15	11,14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
3701	15	13	24	29	18	14	11,14	13	11	11	24	13	12	15	12	19
3702	16	13	24	29	16	13	11,14	13	11	12	23	13	12	15	13	19
3703	15	13	23	29	17.2	14	14,17	12	10	12	20	11	11	14	10	20
3704	15	13	23	29	17	14	11,15	13	10	12	23	14	12	15	12	19
3705	15	13	24	29	16	14	12,15	14	11	11	24	13	12	15	12	19
3706	16	13	24	30	14	13	17,18	13	10	10	21	11	11	14	10	20
3707	14	13	24	29	17	15	11,15	13	10	12	23	13	12	15	12	20
3708	16	13	23	28	17	14	11,15	13	10	11	23	13	12	15	12	19
3709	16	14	23	30	17	14	11,14	13	11	13	23	13	11	14	12	18
3710	17	14	24	30	18	13	13,13	13	9	10	21	11	12	14	10	20
3711	17	13	23	30	16	13	15,16	13	10	11	21	11	12	14	10	20
3712	16	13	24	30	17	14	11,14	13	11	13	23	13	12	15	12	19
3713	17	14	24	30	18	14	11,15	13	10	12	24	13	12	15	12	19
3714	17	13	24	29	17	14	11,15	13	10	12	23	14	11	15	12	19
3715	16	14	24	31	18	13	16,18	12	11	12	23	11	12	14	11	20
3716	15	10	24	26	19	14	11,14	13	11	12	23	14	12	15	12	19
3717	16	13	22	30	16	13	12,16	13	8	13	21	11	12	14	10	22
3718	17	12	25	29	17	14	11,14	13	10	12	23	13	12	15	12	19
3722	15	13	24	29	17	15	11,13	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3723	15	13	25	29	16	15	13,14	13	11	10	23	13	12	15	12	19
3724	15	12	24	28	17	14	10,14	13	10	12	23	13	11	14	12	18
3725	15	12	24	30	18	13	16,16	13	10	11	23	11	12	14	10	19
3726	16	13	25	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	11	14	12	18
3727	15	13	24	28	18	15	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3728	17	13	23	28	18	14	11,14	13	11	12	24	13	12	15	12	19
3729	15	13	24	29	19	15	11,14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
3730	16	13	24	29	17.2	14	11,13	14	11	12	23	13	12	15	12	19
3731	15	14	24	31	18	15	13,15	12	10	11	20	11	10	16	9	19

Continua

Amostra	Continuação															
	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	YGATA H4	DYS437	DYS438	DYS448
3732	16	13	24	28	17	14	12,14	13	10	12	24	13	12	14	12	19
3733	16	13	25	30	15	16	11,16	13	10	10	24	11	12	15	11	20
3734	15	13	24	29	18.2	14	12,15	12	10	12	21	11	12	14	10	19
3735	15	14	24	30	18	14	11,14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
3736	15	14	25	30	17	14	11,14	13	11	12	23	14	12	15	12	19
3737	17	12	21	29	15	15	13,15	14	10	11	21	11	11	16	10	23
3738	15	12	24	27	16	15	15,16	13	10	11	21	14	11	14	9	19
3739	15	13	24	29	18	14	8,14	13	10	11	23	13	12	15	12	19
3740	15	13	24	29	18	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3741	16	13	25	29	18	14	11,13	13	11	12	24	13	13	15	12	19
3742	15	14	24	30	17	14	11,14	13	11	13	23	13	12	15	12	19
3743	15	12	23	29	16	14	13,16	12	10	12	20	11	11	15	9	20
3744	13	12	24	28	16	15	13,17	13	10	11	21	11	11	16	9	19
3745	16	13	25	29	17	14	11,15	11	11	12	23	13	12	15	12	19
3746	15	13	24	28	17	14	10,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3747	15	13	24	28	16	14	12,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3748	14	14	24	29	18	13	13,14	13	9	10	21	11	12	14	10	21
3749	15	14	24	30	18	14	11,14	13	11	13	23	13	12	15	12	19
3750	15	13	21	30	16	16	15,16	13	10	13	23	11	11	14	11	19
3751	15	12	21	29	17	15	13,15	13	10	11	21	11	11	16	10	23
3752	13	13	22	31	17	15	16,18	14	10	11	21	12	11	15	10	20
3753	15	14	24	30	16	14	11,14	13	11	12	24	13	11	14	12	18
3754	18	12	22	29	16	15	15,15	13	10	13	21	11	12	16	11	21
3755	15	13	24	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	18
3756	16	13	26	29	18	14	11,14	13	10	12	23	13	12	15	12	19
3757	14	12	22	28	14	14	13,14	13	10	13	21	11	11	16	10	20
3758	17	13	25	29	17	15	12,14	13	10	12	23	13	11	15	13	19
3759	15	14	23	31	18	15	12,16	14	10	10	21	13	11	14	9	19
3760	15	13	24	29	18	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	18
3761	18	13	24	30	17	14	18,18	13	10	12	20	10	13	14	10	20
3762	14	13	23	28	19	16	12,12	13	10	13	22	11	11	15	10	21
3763	16	13	24	31	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3764	15	13	23	31	15	15	14,14	14	10	9	21	12	12	15	10	21
3765	16	13	24	29	17	14	11,14	13	12	11	23	13	12	15	12	19
3766	16	14	24	30	16	14	11,15	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3767	14	13	23	29	16	14	14,15	12	10	12	21	11	12	15	9	21
3768	16	13	24	30	17	14	11,14	13	11	12	23	13	11	16	12	18
3775	16	14	24	30	17	14	11,14	13	11	12	23	13	11	15	12	19
3776	15	14	25	31	17	14	13,14	13	10	13	23	13	11	14	12	18
3777	14	12	24	29	14	13	17,17	13	10	10	22	11	11	14	10	19
3778	14	12	21	28	17	15	13,15	14	10	11	21	11	11	16	10	22
3779	13	12	24	28	15	15	13,17	12	10	11	21	11	11	15	9	19
3780	16	14	24	30	18	13	13,14	13	9	10	21	11	12	14	10	20
3781	15	13	25	29	16.2	14	14,18	12	10	11	22	11	11	14	10	20
3782	13	12	23	28	17	15	14,17	12	10	12	20	11	11	16	9	20
3783	15	13	24	29	17	14	12,14	13	10	12	23	13	12	15	12	18
3784	17	13	23	29	16	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3785	17	13	24	29	18	14	11,14	14	10	11	23	13	12	14	12	18
																Continu

Continua

Amostra	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	YGATA H4	DYS437	DYS438	DYS448
3786	14	12	22	29	16	14	13,14	13	10	11	22	11	11	16	10	20
3787	16	13	25	29	17	14	11,14	13	10	12	23	13	12	15	13	20
3788	16	15	25	32	15	15	11,14	12	10	11	23	11	12	14	11	20
3789	16	13	24	31	15	13	17,17	13	10	13	23	11	12	14	10	20
3790	15	13	25	31	16	14	16,17	14	10	11	24	11	12	14	10	20
3791	15	13	23	29	17	15	11,14	13	10	12	23	13	12	15	12	19
3792	15	12	22	29	16	15	14,14	15	10	11	20	11	11	16	11	20
3793	15	13	24	31	15	15	13,17	12	10	11	22	11	10	14	10	20
3794	15	13	25	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	20
3795	15	14	23	30	17	14	12,14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
3796	17	13	22	30	19	15	14,14	13	11	12	21	11	11	16	10	21
3797	15	13	23	29	17	14	11,14	13	11	11	23	13	11	14	12	19
3798	15	13	23	30	17	15	11,14	13	11	11	23	13	13	15	12	19
3799	16	13	25	30	15	15	17,18	13	9	11	24	12	12	14	10	20
3800	14	13	22	29	17	16	15,17	13	10	11	20	12	11	15	10	20
3801	15	12	24	28	17	14	11,11	13	10	11	24	13	13	15	12	19
3802	16	13	24	28	17	13	11,14	13	11	12	22	14	12	14	12	19
3803	16	14	24	31	18	15	11,15	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3804	16	13	24	29	17	14	11,15	13	11	12	23	13	12	14	12	19
3805	15	13	24	31	14	13	15,18	13	10	12	21	11	11	14	10	20
3806	14	12	23	29	15	14	14,14	13	10	13	22	11	11	16	10	20
3807	14	12	23	29	15	14	14,15	13	10	12	22	11	11	16	10	20
3808	15	13	24	29	17	15	11,14	13	10	12	23	13	12	14	12	19
3809	15	13	24	29	17	14	11,17	13	11	12	23	13	12	14	12	19
3810	15	13	22	29	18	15	11,14	12	11	11	23	13	12	16	12	19
3811	15	13	24	29	17	15	12,16	13	11	13	23	13	11	14	12	18
3812	15	13	22	29	17	14	12,14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
3813	16	14	24	30	19	13	13,14	13	9	10	21	11	12	14	10	20
3814	16	13	24	29	16	14	11,15	12	11	13	24	13	12	15	12	19
3815	15	14	23	29	15	14	11,14	13	11	12	23	13	11	15	12	19
3816	16	14	24	30	18	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	18
3817	16	13	25	31	19,2	13	10,14	12	10	11	22	11	11	14	10	20
3818	15	12	22	28	15	14	13,14	13	10	11	22	11	11	15	10	20
3822	16	13	23	29	17	14	13,16	12	10	11	23	11	10	15	9	20
3823	15	13	25	29	18	14	11,16	13	10	12	23	13	12	15	13	19
3824	16	13	21	30	16	15	15,16	13	10	13	25	11	11	14	11	21
3825	16	13	25	30	16	15	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3826	15	13	21	30	16	17	17,17	15	10	12	21	11	11	14	11	21
3827	15	13	24	30	17	14	14,14	14	11	12	23	13	12	15	12	20
3828	14	14	23	30	19	15	11,14	13	11	11	21	11	11	16	10	20
3829	16	12	22	29	17	15	13,14	14	10	12	21	11	12	16	10	21
3830	15	13	24	31	16	14	15,15	13	9	12	21	13	11	14	9	20
3831	15	13	25	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	11	14	12	18
3832	15	14	22	31	18	15	14,14	13	10	12	21	11	11	16	10	21
3833	16	13	24	29	16	14	11,15	13	10	12	23	13	12	15	12	19
3834	16	13	24	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3835	16	13	23	28	16	14	11,15	13	10	11	23	13	12	15	12	19
3836	14	13	24	29	17	14	11,14	13	11	11	24	13	12	15	12	19

Continua

Amostra	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	YGATA H4	DYS437	DYS438	DYS448
3837	16	13	24	29	16	14	11,14	13	10	12	23	13	13	15	13	19
3838	16	13	24	29	17	14	12,14	13	11	12	23	14	12	15	13	19
3839	15	12	24	30	15	13	17,18	13	10	10	22	11	11	14	11	20
3840	16	12	24	26	17	15	12,14	13	11	10	24	13	12	15	12	19
3841	16	14	24	31	19	14	11,15	14	11	14	23	13	12	15	12	19
3842	16	13	24	29	18	14	11,14	13	11	11	24	13	11	14	12	17
3843	16	13	24	29	17	14	11,15	13	10	11	23	13	12	15	12	20
3844	15	14	24	29	18	14	11,14	12	11	12	24	14	13	15	12	19
3845	17	12	25	28	15	15	11,13	13	11	11	23	11	12	14	11	20
3846	15	14	24	30	18	14	12,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3847	15	13	24	29	16	14	11,14	12	11	13	23	13	12	15	12	20
3848	15	13	24	30	17	14	11,12	12	10	13	23	13	13	15	12	19
3849	17	13	24	28	18	14	11,15	13	10	11	23	13	12	15	12	19
3850	15	14	24	30	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3851	15	14	23	30	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3852	14	14	25	29	17	17	12,12	13	9	12	23	11	11	15	10	21
3853	15	13	23	29	18	14	11,14	13	11	12	23	13	11	15	12	19
3854	17	13	24	30	17	15	11,14	13	10	13	23	13	11	15	12	19
3855	16	13	24	30	18	14	10,13	14	10	12	23	13	12	15	12	19
3856	16	13	24	30	18	15	11,14	13	10	14	23	13	11	15	12	19
3857	15	14	24	30	19	13	13,15	13	9	10	21	11	12	14	10	20
3858	16	13	23	29	17.2	14	13,16	12	10	12	21	11	11	14	10	21
3859	16	13	24	30	17	14	11,14	13	11	12	23	13	11	15	12	19
3860	16	13	23	29	16	14	11,14	13	10	12	24	13	12	15	11	19
3861	15	13	24	29	17	15	11,14	13	10	10	23	13	11	15	12	19
3862	16	13	25	29	18	14	11,14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
3900	15	12	22	28	16	15	14,14	13	10	11	21	11	11	16	10	21
3901	15	13	24	29	16	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	13	19
3902	14	12	24	30	14	13	17,17	13	10	10	21	11	11	14	10	20
3903	18	13	24	31	15	15	19,20	13	10	12	20	11	12	14	10	20
3904	17	13	24	30	15	13	16,18	13	10	12	24	11	11	14	10	20
3905	14	13	21	30	16	15	17,17	12	10	13	21	14	10	16	10	19
3906	15	12	23	29	15	15	14,15	14	10	11	21	11	12	14	10	21
3907	13	12	23	28	17	15	14,17	12	10	12	21	11	11	16	9	20
3908	15	13	24	29	18	14	12,14	13	11	12	23	13	11	15	12	19
3909	17	13	24	32	18	15	12,13	13	11	12	24	13	12	14	12	18
3910	15	13	24	30	17	14	12,14	13	10	13	23	13	12	14	12	20
3911	17	14	24	31	17	16	12,17	13	11	11	21	11	11	14	10	20
3912	16	14	24	30	19	13	13,14	13	9	10	21	11	12	14	10	20
3913	15	13	24	30	18	15	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3914	15	13	24	29	16	14	14,14	13	11	12	24	13	12	15	12	19
3915	15	13	24	29	17	15	12,14	13	10	12	23	13	12	14	12	19
3916	15	12	24	28	16	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3917	15	12	22	29	17	15	13,14	14	11	11	21	11	11	16	10	22
3918	15	12	24	28	15	15	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3919	16	15	25	32	15	14	11,14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
3920	16	13	24	29	18	14	11,14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
3921	16	13	23	30	19	15	11,15	13	11	11	23	13	12	14	12	19

Continua

Amostra	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	YGATA H4	DYS437	DYS438	DYS448
3922	13	13	23	28	18	17	12,12	13	11	11	21	11	12	16	10	20
3923	15	13	24	30	16	13	15,16	13	10	12	22	14	11	13	11	19
3924	15	13	24	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	18
3925	15	13	24	29	15	15	11,15	13	11	13	23	13	11	15	12	20
3926	15	14	24	30	18	13	12,14	13	9	10	22	11	11	14	10	20
3927	15	13	24	29	19,2	14	12,15	12	10	11	21	11	12	14	10	19
3928	15	13	23	30	16	14	13,19	14	10	11	22	11	11	15	9	20
3929	15	14	23	32	15	15	15,15	13	10	11	21	12	11	14	10	20
3930	14	12	22	28	15	15	13,14	13	10	11	22	11	11	16	10	20
3931	14	13	24	29	16	16	10,12	13	10	11	22	11	12	15	10	20
3932	16	13	24	29	17	14	12,14	14	11	11	23	13	12	15	10	18
3933	16	13	24	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	14	12	19
3998	17	13	23	29	17	14	12,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
3999	16	12	24	28	19	14	11,14	13	10	11	23	13	12	14	12	19
4000	17	14	24	30	18	14	10,13	13	11	13	23	13	11	14	12	-
4086	14	13	23	28	16	16	12,12	13	10	13	21	11	12	14	10	21
4087	18	13	25	30	18	14	11,14	13	10	11	23	13	12	14	12	18
4088	16	13	23	29	15	15	15,15	14	11	12	20	12	11	15	10	20
4089	15	13	23	29	17	14	11,14	13	10	11	23	13	12	14	12	19
4090	15	13	24	29	16	14	11,14	14	11	12	23	13	13	16	12	19
4091	16	14	23	31	18	14	14,15	13	10	11	23	11	11	14	9	21
4095	17	13	25	32	19	16	12,16	13	10	11	24	11	12	15	10	22
4104	16	13	24	29	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
4108	16	14	23	30	17	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
4109	15	12	24	28	17	15	11,14	13	10	12	24	13	11	15	12	19
4115	15	13	24	29	17	14	12,14	13	11	12	23	13	13	15	12	19
4129	15	13	23	29	18	14	11,14	13	11	11	23	15	11	15	12	19
4130	15	13	24	29	16	14	14,14	13	10	12	23	13	12	16	13	19
4139	16	14	24	31	17	14	11,14	13	11	13	23	13	13	15	12	19
4147	17	14	24	30	17	15	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
4149	15	13	24	30	16	14	12,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
4150	16	13	25	28	17	14	11,14	13	10	12	24	13	12	15	12	19
4154	17	14	24	30	15	14	11,15	13	11	12	23	13	11	14	12	18
4156	15	13	24	29	17	14	11,11	13	10	12	23	13	11	14	12	19
4157	15	13	24	29	17	14	11,14	13	11	13	24	13	11	15	12	21
4158	16	13	23	29	17	14	13,16	12	10	12	22	11	11	15	9	19
4159	15	13	24	29	20	14	11,11	13	11	13	23	13	9	15	11	19
4165	15	13	24	31	17	14	11,11	13	11	11	25	15	12	15	12	18
4181	15	13	24	29	16	15	11,16	13	11	12	23	13	12	15	12	19
4186	16	13	23	29	17	14	11,14	14	10	11	24	13	12	15	12	18
4190	15	14	23	30	17	13	14,16	13	10	11	20	13	12	14	9	19
4221	16	13	24	30	17	15	11,14	13	10	12	23	13	11	15	12	19
4222	16	13	23	29	16	15	11,13	13	11	12	23	14	12	15	12	19
4236	16	13	23	28	17	13	13,15	13	10	13	21	13	11	14	9	19
4608	16	14	24	29	17	13	13,14	13	9	10	21	11	12	14	10	20
4609	15	13	24	29	18	14	11,14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
4610	17	13	25	30	16	13	15,17	13	10	11	23	11	12	14	10	21
4611	16	13	24	30	17	15	11,15	13	11	12	23	13	12	15	12	19

Haplótipos de 8 X-STR (Argus X-8) de indivíduos com cancro da próstata

Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
3566	11	12	14	15	36	9	32.2	27	3790	12	12	16	15	40.3	17	29.2	20
3567	11	13	14	14	36	8	27.2	20	3791	12	13	15	15	41.3	18	31	20
3568	12	13	13	15	35	18	30.2	18	3792	10	15	13	14	36	7	31	19
3569	10	12	15	13	38	9	31.2	19.1	3793	12	14	14	14	36	8	32	23
3570	11	13	14	14	39.3	15	28.2	26	3794	11	14	15	13	33	15	30.2	22
3571	10	15	15	15	35	16	31.2	20	3795	12	11	14	14	37	19	27.2	20
3577	10	12	15	14	36	18	32	26	3796	11	12	16	15	36	19	28	25
3578	11	11	16	15	39	15	27.2	25	3797	11	12	15	12	34	15	32.2	24
3579	11	13	16	15	36	14	32	27	3798	10	14	13	16	38	17	31	21
3580	12	11	14	17	37	17	29.2	26	3799	10	15	13	14	32	9	29.2	21
3581	12	13	14	14	37	18	32.2	29	3800	11	12	15	15	35	16	30.2	21.1
3582	12	12	14	15	37	8	29.2	21.1	3801	12	13	13	13	31	8	31	26
3583	12	12	16	15	36	17	32.2	24	3802	10	13	16	14	31	15	33.2	20
3584	12	13	15	14	43.3	7	31.2	25	3803	12	12	14	14	43.3	17	30.2	27
3596	11	14	14	12	34	16	31.2	24	3804	10	11	14	13	36	7	30	19
3597	11	14	15	13	36	8	31	22	3805	12	13	15	13	39.3	8	28.2	17
3598	11	12	14	14	36	19	29.2	26	3806	10	13	15	13	35	18	33	19.1
3599	10	14	15	13	34	17	30.2	20	3807	12	14	14	12	36	17	31	20
3600	10	12	14	13	36	7	28.2	22	3808	11	11	13	14	35	8	31.2	27
3601	10	13	15	15	38	17	32	21	3809	12	11	14	13	34	15	28.2	23
3602	12	13	13	14	38	8	29.2	19	3810	11	13	14	14	37.3	9	27.2	19
3603	12	12	15	12	35	14	29.2	17	3811	12	9	14	13	37	16	33	25
3604	12	12	14	14	38	15	29.2	21	3812	12	12	15	15	40.3	5	29.2	18
3605	12	13	14	14	37	15	31	17	3813	11	12	14	15	34	17	28.2	22.1
3606	11	11	14	13	35	8	28.2	24	3814	11	12	14	13	37.2	17	28.2	20
3607	11	12	16	15	34	19	30.2	25	3815	11	14	15	14	35	17	30.2	22
3608	12	13	15	14	36	17	30.2	20	3816	11	12	15	14	36	9	29	25
3609	10	11	13	15	36	15	29.2	19	3817	12	11	16	14	38	8	28.2	18
3610	12	13	14	13	33	17	31.2	18	3818	11	14	15	14	37	16	33	26
3611	12	13	17	14	40	18	30	18	3822	10	11	14	15	39.3	15	29.2	28
3612	12	13	13	16	36	17	30.2	21	3823	10	13	14	14	35	17	31	23
3613	10	12	15	13	38	17	32	31	3824	11	12	15	13	38.3	13	32.2	22
3614	11	11	15	13	40.3	17	30.2	21	3825	12	12	14	13	37	15	29.2	28
3615	12	11	16	13	39.3	15	28	21	3826	10	11	14	13	36	15	31	23
3616	12	12	14	15	35	16	30.2	30	3827	9	12	15	14	35	16	29.2	22
3617	10	13	15	13	35	18	29.2	23	3828	11	12	13	15	35	16.2	28.2	33
3618	11	11	14	14	36	17	29.2	21	3829	10	14	15	13	38	18	26	22
3619	11	13	14	15	38.3	16	31.2	24	3830	10	14	15	15	37	8	29.2	29
3636	11	14	15	14	36	16	29	24	3831	10	13	15	14	37	15	31.2	18
3637	11	14	16	15	36	8	31	22	3832	13	12	15	14	37	8	28.2	23
3638	12	13	14	12	35	8	30	19	3833	12	12	14	15	37	18	29	21

Continua

									Continuação								
Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
3639	12	12	15	12	39.3	18	30	22	3834	12	12	15	13	39	162	29.2	21
3640	10	12	13	15	31	14	27.2	25	3835	10	13	15	14	36	18	29.2	23
3641	10	12	14	16	34	15	28.2	17	3836	13	13	14	12	37	18	30	26
3642	10	13	16	15	35	17	33	23	3837	10	12	16	12	38	17	27.2	19
3643	10	13	14	15	38	17	29.2	27	3838	11	13	16	13	38.3	18	31	22
3644	10	13	13	14	37	16	30	23	3839	11	13	15	13	41.3	18	28.2	29
3645	11	12	16	14	37	16	29	19	3840	12	12	14	14	39.3	18	26.2	31
3646	11	12	15	15	38	17	31.2	26	3841	12	12	15	12	35	8	28	22
3647	10	13	15	13	32.1	16	30	22.1	3842	12	12	14	11	39.3	17	30	31
3648	11	12	15	14	36	18	30.2	26	3843	12	13	14	13	36	19	33	17
3649	12	14	15	14	37	15	31	26	3844	10	12	15	14	35	16	28	21
3650	11	14	14	13	33	8	34	18	3845	10	11	16	15	35	18	28.2	24
3651	11	12	15	14	35	16	31.2	21	3846	12	14	13	14	35	16	32	19
3652	12	12	17	12	36	8	31	17	3847	10	12	15	13	42.3	8	29.2	19
3653	11	13	15	13	40.3	8	32	27	3848	11	11	16	14	37	19	27.2	21
3696	10	11	15	12	35	8	30.2	24	3849	10	12	15	15	34	15	32.2	21.1
3697	11	14	15	13	36	17	32	31	3850	9	11	14	15	32	8	31.2	18
3698	9	13	16	15	35	8	31.2	20	3851	10	13	14	13	33	17	31	19.1
3699	12	15	14	12	35	8	31.2	27	3852	11	11	14	14	37	15	30.2	18
3700	10	11	14	13	38	17	29.2	21.1	3853	10	13	13	14	37	15	31	22
3701	12	14	15	13	37	17	33	21	3854	12	12	13	13	35	17	29	19
3702	12	13	15	13	39	8	30	26	3855	12	12	14	14	34	18	31.2	19
3703	10	13	14	12	38	8	30.2	28	3856	14	13	13	14	36	8	30	24
3704	10	13	15	14	40	17	29.2	23	3857	12	11	14	12	38	19	29	23
3705	10	12	14	11	31	19	31.2	20	3858	12	13	15	13	36	9	30	26
3706	11	12	16	11	35	18	28	21	3859	10	13	14	13	37	16	26.2	34
3707	12	12	16	12	38	16	33.2	20	3860	9	13	15	13	38	18	31	21.1
3708	10	9	14	15	35	18	30.2	26	3861	11	13	16	13	38	14	34	24
3709	10	10.2	16	14	43.3	18	29.2	19.1	3862	12	12	16	13	32	19	31.2	24
3710	12	13	14	12	35	8	29.2	22	3900	10	12	15	12	42.3	16	31	20
3711	11	12	14	14	34	8	32	22	3901	12	13	14	15	36	9	31.2	29
3712	10	12	16	15	43.3	8	28.2	21.1	3902	11	12	15	14	36	7	31.2	27
3713	11	14	15	13	38.3	17	33.2	25	3903	11	13	15	14	39.3	16	29.2	20
3714	11	13	16	15	38	17	33	28	3904	12	13	14	15	36	8	32.2	30
3715	12	11	14	14	39.3	8	28.2	22	3905	12	14	15	14	36	16	33	21
3716	12	14	15	14	38	18	32	19	3906	11	12	15	13	37	7	30.2	26
3717	10	15	15	14	37	17	33	31	3907	10	13	17	12	36	16	31	23
3718	12	12	15	15	34	18	30.2	18	3908	10	13	16	13	39.3	8	30.2	21.1
3722	11	12	14	13	36	17	30.2	29	3909	12	13	15	14	36	15	30.2	26
3723	11	12	15	13	34	17	27	23.1	3910	10	12	14	12	37	17	29.2	26
3724	12	12	16	13	41.3	15	30	24	3911	10	13	16	14	36	17	32.2	21
3725	12	14	14	15	39.3	15	32	20	3912	11	14	14	15	33	16	30	21
3726	10	12	14	13	38	17	30.2	22	3913	10	14	15	15	37	16	32.2	25
3727	10	14	14	13	38	16.2	30	27	3914	12	12	15	13	37	16	28.2	25
3728	13	13	13	14	36	8	30.2	21	3915	10	12	13	13	36	17	31.2	18
3729	12	12	14	14	36	16	29	17	3916	10	12	15	14	40.3	8	30.2	25
									Continua								

									Continuação								
Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
3730	12	13	16	15	37	18	31	33	3917	12	12	14	13	35	16	31.2	27
3731	12	11	14	17	37	17	29.2	29	3918	10	12	15	16	36	17	30	21
3732	12	12	15	13	35	16	28.2	25	3919	10	13	14	12	37	16	34	24
3733	11	12	16	15	36	17	31	32	3920	12	12	15	14	34	15	32	20
3734	11	12	15	13	36	17	30.2	27	3921	10	12	15	12	37	19	28.2	19
3735	10	14	15	14	38	15	30.2	28	3922	12	14	16	15	34	19	27.2	24
3736	11	13	15	14	35	8	32.2	29	3923	12	11	15	14	40.3	16	29.2	26
3737	12	11	13	14	40.3	14	31.2	28	3924	10	12	15	15	36	16	28.2	21
3738	12	15	16	12	36	17	30	25	3925	10	12	16	13	35	18	28.2	23
3739	12	11	14	14	34	17	30.2	26	3926	12	12	14	13	36	16	28	29
3740	11	12	16	13	33	8	32	27	3927	11	10	15	13	35	17	30.2	28
3741	10	13	15	14	36	16	29.2	20	3928	11	12	16	15	36	15	29.2	24
3742	12	13	15	14	33	18	28	24	3929	10	11	15	12	37	16	29.2	20
3743	11	13	13	14	35	18	29.2	30	3930	11	15	14	13	35	8	30	23
3744	10	13	15	13	36	9	27	20	3931	10	13	14	13	42.3	17	29	21
3745	10	12	15	13	36	15	29.2	25	3932	10	13	14	13	38	17	34	21
3746	11	13	16	16	33	16	28.2	24	3933	10	12	15	14	35	18	28.2	17
3747	10	14	15	13	34	15	31	22	3998	11	12	15	12	37	15	28	29
3748	11	11	15	14	37	16	28.2	29	3999	10	13	13	13	34	20	31	20
3749	11	13	15	16	36	17	30.2	24	4000	11	14	14	16	36	11	29	26
3750	11	13	13	15	37	12	32.2	17	4086	12	11	15	12	34	17	28.2	20
3751	11	11	16	17	36	13	29.2	28	4087	12	12	15	15	33	17	29.2	26
3752	12	13	16	15	42.3	15	29	26	4088	10	11	17	12	37	17	29.2	22
3753	11	14	15	11	37	17	32	26	4089	12	13	15	12	39.3	8	31.2	21.1
3754	11	12	15	13	36	17	29.2	26	4090	11	11	15	15	36	18	28.2	25
3755	10	12	15	13	36	7	30	28	4091	11	13	16	15	35	8	32	29
3756	12	13	14	15	34	16	29.2	21	4095	11	11	16	13	35	16	29.2	22
3757	11	13	14	14	37	16	32	28	4104	11	12	15	14	37	17	30.2	24
3758	12	14	14	14	39	18	31.2	26	4108	10	13	15	14	36	16	31	19.1
3759	11	12	16	13	33	16	28.2	23	4109	11	12	14	14	35	16	28.2	25
3760	10	14	15	12	36	17	31.2	29	4115	10	12	17	12	34	18	29.2	29
3761	11	12	15	13	36	7	30.2	26	4129	11	11	13	15	37	19	29.2	29
3762	12	12	16	13	39.3	17	28	25	4130	11	15	16	14	39	17	30	28
3763	12	16	13	14	36	17	28	20	4139	10	14	14	12	37	18	30	18
3764	10	11	15	13	34	17	31.2	20	4147	11	13	15	15	41.3	18	30.2	30
3765	12	13	14	13	38	16	31.2	30	4149	12	13	15	13	37	18	31.2	31
3766	11	13	15	15	36	19	31	26	4150	12	12	15	13	37	18	28.2	21
3767	10	14	13	13	36	18	33	29	4154	11	13	14	13	41.3	18	28.2	20
3768	10	13	16	12	32	17	31	23	4156	10	12	15	14	41.3	17	31.2	28
3775	12	12	16	14	36	17	28	22	4157	11	12	15	13	34	16	31.2	21
3776	10	13	14	15	35	17	30.2	21.1	4158	10	12	15	13	36	16	28	25
3777	10	12	14	14	35	8	28.2	23	4159	10	11	16	12	34	17	29.2	22
3778	10	13	15	14	39	15	31	19.1	4165	10	12	16	13	39.3	16	28.2	20
3779	10	11	14	13	36	17	28.2	20	4181	11	12	15	13	38	17	30	23
3780	12	11	15	13	38	16	31.2	21.1	4186	11	14	14	14	42.3	19	31	25
3781	11	15	16	13	35	18	31	28	4190	12	13	14	15	35	15	28.2	17
Continua																	

									Continuação								
Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
3782	10	12	14	13	39.3	7	30.2	22	4221	10	13	14	13	38	18	32	22
3783	10	12	15	13	37	17	29	27	4222	12	12	14	12	35	17	32	21
3784	12	13	13	14	37	8	31	28	4236	12	15	14	15	35	17	30	23
3785	11	14	15	13	36	17	31.2	29	4608	10	13	15	15	36	12	28.2	27
3786	11	12	16	15	36	17	28.2	251	4609	10	14	15	12	37	16	32	23
3787	12	13	16	13	39	18	26.2	19	4610	10	13	14	15	38	15	31	20
3788	11	13	16	15	35	15	28.2	24	4611	12	11	14	15	34	8	27.2	25
3789	12	11	16	15	34	17	29.2	17									

Haplótipos de 8 X-STR (Argus X-8) de indivíduos “normais”

Amostra									Amostra								
	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135		DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
C001	11	13	17	15	36	17	30.2	26	A100	11	13	15	13	37	17	31	31
C002	11	13	15	14	41.3	19	29.2	22	A101	10	12	14	13	40.3	16	28.2	24
C003	10	14	17	15	34	15	33	26	A102	12	12	15	15	35	8	27.2	19
C004	11	13	15	14	36	16	33.2	26	A103	12	13	15	13	38	7	30.2	30
C005	12	12	16	14	34	18	27.2	30	A104	10	12	14	15	40.3	19	28.2	18
C006	11	13	15	14	36	19	30.1	29	A105	11	12	16	14	33	18	28	25
C007	11	13	15	14	38.3	17	29.2	26	A106	11	12	15	17	36	8	27.2	20
C008	11	13	15	12	39.3	10	29	29	A107	10	14	16	12	36	17	30	19
D001	10	11	15	14	35	18	31.2	22	A108	12	12	15	14	39.3	14	27.2	25
D002	10	13	15	12	36	8	31	24	A109	11	11	14	14	35	18	29.2	19
D003	11	12	16	12	34	17	32.2	18	A110	12	13	15	13	35	16	34	23
D004	10	12	14	13	36	17	28	22	A111	10	14	14	13	36	18	31	17
D005	12	14	17	13	38	16	30.1	23	A112	12	15	13	15	41.3	19	29.2	22
D006	12	12	15	15	35	15	30.1	29	A113	12	12	15	14	38	14	28.2	19
D007	12	13	15	13	35	17	31	33	A114	10	13	14	13	35	8	30.2	21.1
D008	12	12	13	14	37	17	28	23	A115	12	13	13	13	36	18	32.2	21
D009	10	13	14	12	37	18	33	23	A116	10	11	15	14	35	8	34	26
D010	11	11	13	13	35	8	28.2	28	A117	11	13	14	13	33	17	29.2	18
D011	12	11	14	15	35	17	38	19	A118	12	11	14	12	36	8	30.2	22
D012	10	11	14	14	34	9	31	25	A119	11	14	16	14	38	17	29.2	30
D013	12	14	14	13	36	7	28.2	17	A120	11	12	14	13	36	7	28.2	29
D014	13	13	15	13	37	17	29.2	28	A121	11	12	14	14	38.3	20	31.2	18
D015	11	14	14	17	36	15	30.1	19	A122	11	12	16	14	35	17	27.2	29
D016	11	11	16	14	40.3	17	30	25	A123	11	12	15	14	37	16	26.2	26
D017	10	13	15	14	35	18	30.1	23	A124	11	11	13	15	35	18	33	31
D018	10	11	14	12	39.3	16	28.2	23	A125	11	12	14	13	35	20	27.2	28
D019	12	11	15	16	39.3	16	29.2	26	A126	12	13	15	15	34	7	31	20
D020	11	15	14	15	39.3	16	32.2	23	A127	12	13	13	12	35	18	28.2	19
D021	13	11	13	15	36	8	29.2	27	A128	10	11	16	14	37	8	29.2	22
D022	10	14	16	14	40.3	16	32.2	20	A130	10	12	15	14	36	8	28.2	20
D023	12	13	15	13	36	15	30	23	A131	10	13	15	13	39	19	32	19

Continua

									Continuação								
Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
D024	11	13	14	14	36	18	30.1	20	A132	11	12	15	12	36	18	30.2	26
D025	11	12	16	15	35	17	29	22	A133	11	13	15	13	38	18	29.2	22
D026	12	12	15	14	40.3	17	29.2	26	A134	11	12	14	14	34	18	29.2	17
D027	12	12	14	15	35	17	30.1	20	A135	11	13	14	15	37	17	30.2	24
D028	12	13	15	12	35	8	31	22	A136	10	14	15	14	36	18	33	23.1
D029	10	15	13	14	37	18	29.2	23	A137	11	13	14	12	38.3	19	30	27
D030	12	13	13	14	35	17	31.2	28	A138	12	12	15	15	36	17	31.2	21
D031	10	12	16	14	35	16	31.2	22	A139	12	14	14	14	36	8	30.2	18
D032	10	15	15	13	35	16	31	23	A141	11	11	14	14	372	19	28.2	23.1
D033	11	11	16	14	37	17	28.2	21	A142	11	12	15	13	37	18	28	26
D034	12	10	15	13	38.3	19	30.1	19	A143	10	13	16	14	41.3	16	32	24
D035	10	13	15	14	38	17	31	18	A144	12	13	16	13	373	9	30.2	20
D036	12	15	13	11	35	20	31	27	A145	10	12	14	13	38	18	27.2	20
D037	12	15	17	13	42.3	18	31	26	A146	10	14	16	14	36	8	28	23.1
D038	11	11	16	13	33	19	29.2	22	A147	10	14	15	15	39.3	17	32	21
D039	11	11	15	12	39.3	15	28.2	23	A148	12	14	14	13.3	39.3	18	30	23
D040	11	12	13	13	41.3	16	31.2	24	A150	10	13	14	13	37	17	29.2	21
D041	12	13	15	13	34	19	30.1	20	A151	12	13.2	15.1	13.2	35	17	31.2	21.1
D042	13	13	15	13	36	7	30.1	26	A152	11	12	15	15.2	39	17	30	25.1
D043	11	12	15	15	35	8	26.2	24	A154	10	12	13	13	36	8	30.2	25.1
D044	11	13	15	13	34	16	33.2	18	A155	12	14	15	12	37	8	31	29
D045	11	13	15	13	35	7	27.2	21	A156	11	13	14	12	36	8	32	17
D046	11	12	15	12	35	18	26.2	24	A157	12	12	16	13	36	17	28.2	29
D047	11	12	16	16	38	17	27.2	31	A158	12	13	16	14	36	18	30.2	22.1
D048	11	12	14	14	34	16	27.2	26	A159	10	12	14	12	36	8	31.2	18
D049	10	12	14	12	34	8	32.2	18	A160	11	14	14	15	37	15	31.2	25
D050	12	13	14	13	32	8	31	25	A161	10	12	16	15	37	15	29.2	21
D051	12	12	14	14	40.3	15	24.2	20	A162	12	15	14	14	33	8	31.2	20
D052	12	11	15	13	38	17	30.1	23	A163	11	13	16	14	38	17	31	21
D053	12	12	13	14	33	15	29.2	23	A164	11	11	14	13	373	16	29.2	22
D054	12	12	15	15	35	18	30	27	A165	11	13	13	16	37	16	30	24
A001	10	14	15	14	36	19	28.2	23.1	A167	10	11	15	15	37	7	30.2	23
A002	11	13	14	14	39.3	18	30.2	23.1	A168	11	13	16	15	37	8	27.2	28
A003	13	14	14	14	36	8	31	32	A169	12	15	13	16	38	8	30	22
A004	13	13	14	13	36	13	30	29	A170	10	13	16	14	36	17	31	28
A005	12	13	13	15	35	16	29.2	23	A171	11	15	14	15	36	19	33	25.1
A006	11	11	16	13	40.3	18	28.2	26	A172	10	12	14	14	35	16	31.2	27
A007	11	12	15	13	31	17	31.2	26	A173	11	11	16	13	34	16	28.2	29
A008	10	113	16	14	37	17	30.1	20	A174	10	12	15	13	34	16	30.2	20
A009	11	13	16	14	38	8	331	33	A175	12	13	16	13	41.3	15	30.2	21.1
A010	12	12	14	14	38	17	29	28	A176	10	13	13	13	37	16	31	23
A011	10	11	14	13	36	15	28.2	31	A177	10	12	13	13	37	17	29.2	21.1
A012	12	16	15	12	37.3	17	33	23	A179	11	11	13	12	37	17	30.2	25.1
A013	11	12	14	14	40.3	15	31.2	30	A180	10	12	17	14.2	38.3	15	31.2	23.1
A014	13	14	15	13	36	18	31	23	A181	12	12	15	13	37	18	28.2	21.1
A015	12	11	14	14	38	17	30.1	26	A182	10	12	15	15	36	18	29	25.1
A016	10	12	15	12	37	15	30	26	A183	11	14	15	14.2	36	17	31.2	27
A017	10	12	14	14	35	7	29	19	A184	11	12	15	16	37	18	27.2	28
A018	12	12	14	13	38.3	18	29.2	28	A185	11	13	15	14	39.3	18	30.2	27

Continua

									Continuação								
Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
A019	10	13	14	14	33	17	31	21	A186	12	12	15	13	35	18	30.2	27
A020	12	13	14	12	35	19	31.2	28	A187	12	12	14	12	36	16	30.2	25.1
A021	11	11	16	14	40.3	17	30.2	24	A188	12	13	15	14	36	17	30.2	21.1
A022	12	11	15	12	36	8	29.2	21.1	A190	11	13	14	14	35	18	32	22.1
A023	12	12	14	14	38	17	31.2	19	A191	11	12	15	14	36	16	28	18.2
A024	11	12	15	14	37	16	29.2	26	A192	11	12	15	14.2	37	15	28	27
A025	10	13	15	15	42.3	18	28.2	21	A193	12	17	15	14	41.3	8	28	26
A026	10	12	16	15	37	18	32.2	24	A194	12	11	16	16	33	18	29.2	17.2
A027	11	11	15	15	34	19	30.2	26	A195	11	11	14	13	35	15	30.2	20
A028	13	12	14	15	38	8	28.2	25.1	A196	11	11	14	12	37	19	27.2	27
A029	11	12	13	15	33	17	29.2	29	A197	11	13	15	13	33	19	30.2	25
A030	10	10	17	13	37	16	30.2	27	A198	11	12	14	13	38	16	27.2	24
A031	11	12	16	16	41.3	8	28.2	26	A199	12	13	15	15	30	16.2	30.2	21
A033	10	12	15	14	36	16	31.2	20	A200	11	13	14	13	35	9	31	21
A034	10	14	15	12	36	15	34	21	A201	12	14	14	14	35	8	29.2	23
A035	12	14	15	14	34	17	29.2	21	A202	11	12	15	14	37	18	32.2	28
A036	11	13	14	15	32	9	31.2	23	A203	11	13	15	13	34	7	32.2	31
A037	11	13	14	16	35	172	31	19	A204	10	12	15	12	36	7	28	22
A038	11	14	16	14	34	17	30.2	23	A205	12	14	15	16	36	16	31.2	17
A039	11	14	16	14	34	17	30.2	23	A206	12	14	15	12	36	16	31.2	17
A040	11	12	15	13	39.3	8	32	21.1	A207	10	13	15	12	36	17	30	22.1
A041	10	12	15	14	37	16	28	25.1	A208	10	12	14	16	36	15	29.2	20
A042	13	13	15	12	36	17	30.2	24	A209	12	14	14	14	38.3	14	31	22
A043	10	13	16	14	35	18	30	22.1	A210	11	12	15	14	41.3	18	30.2	25.1
A044	12	12	17	14	42.3	18	31.2	27	A211	11	11	15	13	35	15	28.2	25
A045	12	11	16	15	35	18	29.2	28	A212	10	13	15	12	34	18	32.2	27
A046	12	13	15	15	36	21	31	15.2	A213	11	12	15	12	36	18	28.2	28
A047	11	14	14	13	36	8	34	24	A214	10	14	15	14	33	18	30	21
A048	10	13	15	13	34	15	31	23	A215	12	13	14	14	35	15	34	26
A049	12	12	16	14	37	16	29.2	32	A216	11	12	14	14	39.3	17	29.2	26
A050	12	12	14	12	36	16	34.2	18	A217	11	14	15	14	36	8	32	23
A053	11	14	15	12	37	14	26	30	A218	11	12	14	14	35	16	30.2	23
A054	11	13	16	14	36	16	31	23	A220	10	13	14	13	36	17	33	28
A055	10	13	15	13	38.3	14	31.2	27	A221	12	12	13	17	35	9	30	20
A056	10	12	15	14	42.3	17	30.2	27	A223	11	11	15	16	36	18	30.2	28
A057	11	13	14	15	37	17	30.2	28	A224	10	12	16	15	40.3	18	32.2	21
A058	10	12	14	13	41.3	16	32	27	A225	11	12	15	12	34	8	28.2	22
A059	11	11	16	15	41.3	7	28.2	20	A226	9	13	15	12	40.3	15	29.2	21
A060	12	11	16	13	35	8	29.2	19	A227	10	12	17	14	36	19	30.2	19
A061	11	12	15	13	36	17	29	27	A229	11	12	15	15	33	17	31.2	18
A062	12	12	17	13	36	16	30.2	29	A230	11	12	14	13	36	16	29	33
A063	11	12	16	13	37	18	34	28	A231	12	13	16	14	36	15	30.2	30
A065	11	13	16	13	35	16	29.2	17	A232	10	12	16	15	38.3	16	29	19
A066	13	13	16	14	41.3	8	30	23	A233	10	12	14	14	34	18	28.2	22
A067	11	13	15	15	36	17	30.2	28	A234	11	11	16	14	39	8	28.2	27
A068	10	12	15	12	36	17	28.2	25	A235	10	12	16	14	37	17	28.2	21
A069	10	13	16	12	37	16	31	24	A236	12	12	15	12	36	18	27.2	17
A070	11	14	16	15	36	20	32	21	A237	12	13	16	13	42.3	17	31	27
A071	10	12	14	15	37	9	31.2	31	A238	11	13	14	14	37	18	29.2	22

Continua

									Continuação								
Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	Amostra	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
A072	12	12	13	14	37	8	27.2	23	A239	12	14	15	13	36	18	29	25.1
A073	12	14	16	14	41.3	8	32	21	A240	10	15	14	14	36	16	32	23.1
A074	10	11	13	15	41.3	8	30.2	23	A242	11	12	14	14	36	7	30.2	26
A075	11	14	15	11	34	19	27.2	31	A243	10	12	16	16	39.3	16	29.2	20
A076	14	14	14	14	34	8	31.2	22	A244	12	11	15	14	37	16	29.2	28
A077	10	14	15	12	39	17	32	24	A245	10	13	16	15	35	19	31.2	21
A078	11	13	14	13	35	8	31	23	A246	11	10	15	14	38.3	18	30.2	20
A079	12	13	14	14	36	15	29.2	28	A248	11	13	15	12	39.3	16	31	29
A080	10	13	16	14	41.3	17	32	20	A249	12	13	14	15	34	16	31	17
A081	12	16	15	13	36	17	31	26	A250	12	12	16	14	37	15	30.2	17
A082	13	11	16	12	35	15	28.2	21	A251	12	12	14	15	37	18	28.2	18
A083	10	11	13	15	32	16	29.2	20	A252	10	14	13	15	37	13	28	18
A084	10	12	15	12	36	8	30.2	30	A253	10	11	14	14	35	17	29.2	25.1
A085	11	13	16	15	35	15	30.2	28	A254	12	13	13	13	34	17	29.2	23.1
A086	12	10	14	15	38	15	27	29	A255	10	14	14	13	36	8	34	21.1
A087	12	13	15	12	35	18	31	21	A256	10	12	15	12	34	18	30	25.1
A088	10	13	16	15	35	16	31.2	21	A257	10	12	14	12	37	19	29.2	17
A091	9	12	16	15	36	8	31	25.1	A258	11	12	13	13	37	18	29	26
A092	10	12	14	14	35	15	30	31	A259	11	14	14	14	36	17	31.2	28
A093	10	14	15	13	36	19	31	23	A260	11	12	16	15	39.3	18	28.2	22
A094	11	13	14	14	40.3	18	30	19	A261	12	12	15	17	35	18	29.2	22
A095	12	12	16	12	38	18	25.2	27	A262	13	12	15	14	38	19	31	21
A096	10	14	16	14	37	19	32	20	A263	10	11	15	13	36	15	31.2	25
A097	12	12	14	14	39	8	30.2	23	A264	12	13	15	15	36	17	30.2	21
A098	10	11	14	16	39.3	17	29.2	24	A265	12	11	14	15	37	7	31.2	18
A099	11	11	15	13	39.3	18	29.2	33									

Haplótipos de 10 X-STR (Decaplex X) de indivíduos com cancro da próstata

Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789
3566	11	11	11	11	10	14	33	15	11	20	3790	12	8.3	13	7	6	16	35	15	12	20
3567	11	13	10	11	10	14	31	14	10	21	3791	12	13	10	12	11	15	36	15	9	20
3568	12	13	9	8	6	13	31	15	11	23	3792	10	11	11	9	9	13	28	14	11	20
3569	10	8.3	10	10	6	15	33	13	11	22	3793	12	11	9	7	10	14	32	14	11	20
3570	11	13	9	9	9	14	34	14	11	21	3794	11	12	10	11	10	15	32	13	12	20
3571	10	8.3	11	11	6	15	31	15	11	23	3795	12	13	9	7	6	14	31	14	12	22
3577	10	13	9	7	6	15	36	14	11	23	3796	11	12	11	9	11	16	33	15	12	20
3578	11	12	11	10	6	16	35	14	12	20	3797	11	11	9	11	10	15	32	12	10	20
3579	11	8.3	11	12	8	16	33	15	11	15	3798	10	8.3	10	7	6	13	32	16	11	23

Continua

Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789
3580	12	8.3	10	11	6	14	31	17	11	20	3799	10	12	9	7	8	13	35	14	12	20
3581	12	11	9	7	8	14	33	14	11	20	3800	11	11	12	7	8	15	33	15	11	21
3582	12	13	11	11	10	14	34	15	10	21	3801	12	11	11	11	10	13	33	13	10	20
3583	12	11	10	7	6	16	30	15	11	20	3802	10	8.3	11	7	10	16	35	14	11	21
3584	12	8.3	11	12	12	15	34	14	12	20	3803	12	15	9	12	10	14	31	14	11	20
3596	11	11	11	10	6	14	30	12	8	16	3804	10	12	13	10	11	14	35	13	10	23
3597	11	8.3	11	11	10	15	35	13	11	22	3805	12	12	9	10	12	15	34	13	10	20
3598	11	8.3	10	7	12	14	29	14	9	20	3806	10	11	10	8	11	15	32	13	11	20
3599	10	12	9	9	8	15	32	13	11	20	3807	12	12	11	7	11	14	29	12	9	15
3600	10	11	9	12	8	14	33	13	12	20	3808	11	12	11	12	12	13	34	14	10	16
3601	10	11	9	11	10	15	34	15	11	20	3809	12	13	10	7	10	14	32	13	10	15
3602	12	8.3	10	11	8	13	35	14	11	21	3810	11	8.3	12	9	8	14	32	14	10	23
3603	12	12	10	10	10	15	30	12	10	20	3811	12	12	9	9	6	14	35	13	11	20
3604	12	12	11	7	11	14	33	14	11	20	3812	12	13	12	11	11	15	32	15	10	20
3605	12	11	9	9	9	14	34	14	10	20	3813	11	12	9	9	6	14	34	15	12	20
3606	11	11	11	10	8	14	34	13	11	20	3814	11	12	10	8	11	14	31	13	12	21
3607	11	8.3	11	10	9	16	31	15	11	23	3815	11	12	10	11	10	15	33	14	10	24
3608	12	11	11	7	8	15	33	14	11	21	3816	11	12	10	10	10	15	35	14	11	20
3609	10	8.3	12	7	6	13	31	15	12	20	3817	12	12	10	12	12	16	32	14	10	23
3610	12	11	9	10	10	14	34	13	10	20	3818	11	8.3	11	10	10	15	33	14	12	21
3611	12	11	9	9	6	17	31	14	10	20	3822	10	8.3	9	7	11	14	36	15	11	22
3612	12	13	9	7	8	13	32	16	10	22	3823	10	11	10	7	12	14	35	14	10	20
3613	10	11	9	9	8	15	33	13	9	22	3824	11	12	12	7	6	15	33	13	10	22
3614	11	12	11	12	12	15	30	13	11	21	3825	12	11	9	12	10	14	35	13	11	20
3615	12	8.3	11	10	6	16	31	13	11	20	3826	10	14	9	9	9	14	35	13	11	20
3616	12	8.3	10	10	10	14	31	15	11	21	3827	9	8.3	10	7	10	15	31	14	10	22
3617	10	11	9	11	6	15	34	13	12	21	3828	11	8.3	9	9	10	13	33	15	10	22
3618	11	8.3	11	7	8	14	35	14	10	20	3829	10	13	9	11	11	15	34	13	12	23
3619	11	8.3	9	10	10	14	33	15	11	20	3830	10	9	10	11	9	15	31	15	12	22
3636	11	13	9	11	8	15	33	14	8	22	3831	10	12	9	7	9	15	32	14	11	20
3637	11	11	11	11	11	16	33	15	11	23	3832	13	11	11	7	10	15	34	14	11	22
3638	12	8.3	11	9	10	14	35	12	11	20	3833	12	11	11	11	9	14	31	15	11	15
3639	12	13	11	10	11	15	33	12	10	23	3834	12	8.3	9	11	11	15	34	13	11	21
3640	10	10	9	11	9	13	36	15	10	20	3835	10	8.3	9	11	8	15	31	14	11	20
3641	10	12	10	10	8	14	32	16	12	21	3836	13	12	9	12	9	14	35	12	11	21
3642	10	8.3	10	11	8	16	32	15	12	20	3837	10	11	9	7	11	16	33	12	11	15
3643	10	14	10	7	6	14	32	15	11	20	3838	11	12	10	10	6	16	33	13	10	20
3644	10	12	9	11	10	13	34	14	12	21	3839	11	11	9	7	6	15	34	13	10	23
3645	11	13	9	11	9	16	33	14	11	22	3840	12	8.3	11	9	10	14	30	14	11	22
3646	11	12	9	10	9	15	31	15	10	21	3841	12	14	9	9	8	15	32	12	10	21
3647	10	8.3	11	11	6	15	31	13	11	21	3842	12	8.3	9	10	11	14	34	11	11	15
3648	11	13	11	7	9	15	31	14	11	21	3843	12	8.3	9	7	6	14	33	13	11	20
3649	12	8.3	10	12	6	15	31	14	10	15	3844	10	13	9	7	6	15	32	14	10	20
3650	11	11	9	12	11	14	31	13	10	16	3845	10	8.3	9	11	6	16	34	15	11	21
3651	11	8.3	11	12	8	15	36	14	10	15	3846	12	15	11	9	10	13	33	14	10	20
3652	10	8.3	10	11	8	16	32	15	12	20	3847	10	12	11	9	8	15	31	13	12	20
3653	11	11	9	7	12	15	33	13	10	22	3848	11	11	10	7	11	16	36	14	10	20

Continua

Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789
3696	10	12	11	11	12	15	31	12	12	19	3849	10	12	10	11	10	15	32	15	10	23
3697	11	8.3	11	7	6	15	27	13	12	22	3850	9	13	11	7	10	14	28	15	11	21
3698	9	8.3	11	11	10	16	34	15	12	20	3851	10	13	11	13	8	14	33	13	10	20
3699	12	13	9	7	12	14	34	12	10	21	3852	11	11	9	12	10	14	34	14	11	20
3700	10	12	9	7	6	14	34	13	11	20	3853	10	13	9	11	10	13	33	14	10	21
3701	12	8.3	10	11	8	15	35	13	11	20	3854	12	13	11	11	11	13	30	13	11	20
3702	12	12	11	11	11	15	35	13	11	20	3855	12	8.3	9	10	11	14	33	14	11	20
3703	10	8.3	9	12	10	14	32	12	12	22	3856	14	8.3	10	7	10	13	33	14	11	21
3704	10	12	9	7	8	15	31	14	10	15	3857	12	12	9	10	10	14	33	12	11	23
3705	10	12	9	13	8	14	34	11	11	20	3858	12	8.3	11	7	10	15	33	13	10	22
3706	11	13	9	11	6	16	33	11	11	20	3859	10	12	11	10	8	14	33	13	12	20
3707	12	12	11	11	10	16	33	12	11	22	3860	9	14	9	7	12	15	31	13	12	20
3708	10	12	10	11	8	14	32	15	11	20	3861	11	11	12	10	7	16	34	13	10	21
3709	10	12	9	11	6	16	33	14	11	15	3862	12	13	9	11	10	16	33	13	13	21
3710	12	8.3	9	7	9	14	31	12	11	21	3900	10	12	11	9	8	15	32	12	11	20
3711	11	11	10	9	6	14	32	14	11	20	3901	12	14	11	8	8	14	33	15	11	20
3712	10	12	9	12	11	16	31	15	11	22	3902	11	12	9	13	12	15	31	14	9	21
3713	11	8.3	10	11	8	15	33	13	11	20	3903	11	11	9	7	10	15	34	14	9	20
3714	11	12	10	9	10	16	30	15	10	21	3904	12	12	9	11	6	14	34	15	11	20
3715	12	8.3	11	11	10	14	33	14	11	20	3905	12	12	9	10	11	15	31	14	10	20
3716	12	8.3	9	10	6	15	33	14	11	16	3906	11	8.3	9	10	10	15	33	13	11	20
3717	10	11	11	7	12	15	30	14	10	20	3907	10	8.3	11	11	10	17	34	12	11	21
3718	12	13	10	12	12	15	31	15	12	22	3908	9	12	11	7	11	16	31	13	11	20
3722	11	12	11	11	10	14	31	13	12	21	3909	12	8.3	11	11	6	15	32	14	10	21
3723	11	8.3	11	11	10	15	31	13	10	21	3910	10	13	11	10	6	14	34	12	11	20
3724	12	13	9	11	10	16	33	13	10	20	3911	10	11	10	11	12	16	31	14	11	20
3725	12	12	9	9	10	14	33	15	10	20	3912	11	11	11	9	10	14	33	15	10	22
3726	10	8.3	9	11	8	14	34	13	11	22	3913	10	12	11	9	12	15	33	15	11	22
3727	10	13	9	7	6	14	35	13	10	22	3914	12	12	9	9	11	15	31	13	11	20
3728	13	8.3	9	9	10	13	32	14	10	15	3915	10	11	9	11	8	13	32	13	11	16
3729	12	12	9	11	10	14	35	14	12	23	3916	10	13	9	11	8	15	34	14	11	21
3730	12	8.3	12	9	6	16	33	15	12	20	3917	12	11	9	10	9	14	32	13	12	20
3731	12	12	11	10	11	14	32	17	13	20	3918	10	12	11	12	12	15	34	16	10	22
3732	12	12	14	7	12	15	33	13	8	20	3919	10	12	11	7	6	14	28	12	11	20
3733	11	8.3	9	7	10	16	31	15	10	20	3920	12	13	9	9	10	15	31	14	12	25
3734	11	8.3	9	12	9	15	29	13	10	20	3921	10	12	10	12	12	15	32	12	11	15
3735	10	12	9	11	12	15	32	14	11	21	3922	12	12	11	10	6	16	33	15	10	23
3736	11	12	9	12	10	15	33	14	9	15	3923	12	12	9	10	10	15	34	14	10	20
3737	12	8.3	9	10	8	13	32	14	10	20	3924	10	13	11	11	8	15	34	15	11	19
3738	12	12	10	12	10	16	34	12	11	20	3925	10	8.3	9	9	10	16	33	13	11	22
3739	12	13	11	7	6	14	27	14	11	20	3926	12	15	9	10	6	14	33	13	12	22
3740	11	11	9	10	12	16	35	13	11	20	3927	11	11	9	12	10	15	33	13	11	20
3741	10	13	9	7	10	15	31	15	12	20	3928	11	13	11	9	6	16	27	15	12	16
3742	12	12	9	7	12	15	35	14	11	21	3929	10	8.3	11	10	12	15	31	12	10	20
3743	11	13	9	12	11	13	33	14	10	15	3930	11	8.3	9	10	8	14	34	13	11	20
3744	10	13	10	9	11	15	33	13	11	15	3931	10	11	10	10	8	14	33	13	12	15
3745	10	13	11	10	9	15	33	13	10	20	3932	10	11	9	9	12	14	33	13	10	21

Continua

Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789
3746	11	11	9	7	12	16	35	16	11	21	3933	10	12	11	12	11	15	28	14	12	20
3747	10	13	10	9	9	15	34	13	10	20	3998	11	13	11	10	8	15	33	12	10	23
3748	11	13	9	9	9	15	34	14	10	15	3999	10	12	9	11	8	13	33	13	11	22
3749	11	10	9	7	6	15	33	16	10	15	4000	11	12	11	13	9	14	29	16	10	16
3750	11	10	10	10	11	13	31	15	11	20	4086	12	8.3	10	12	11	15	32	12	12	20
3751	11	11	9	7	8	16	29	17	11	19	4087	12	8.3	9	11	9	15	31	15	10	22
3752	12	14	9	7	8	16	33	15	11	21	4088	10	12	11	12	6	17	33	12	11	22
3753	11	14	11	10	10	15	33	11	10	23	4089	12	8.3	14	11	11	15	33	12	10	23
3754	11	11	10	7	10	15	31	13	11	21	4090	11	13	10	11	12	15	33	15	10	22
3755	10	12	9	7	6	15	33	13	12	20	4091	11	11	11	10	6	16	35	15	10	21
3756	12	13	15	7	11	14	31	15	11	20	4095	11	13	11	9	10	16	34	13	10	22
3757	11	8.3	9	11	8	14	33	14	12	21	4104	11	11	11	11	9	15	31	14	10	15
3758	12	12	12	12	10	14	34	14	11	22	4108	10	8.3	9	9	11	15	33	14	10	21
3759	11	8.3	10	11	8	16	31	13	11	20	4109	11	12	9	11	10	14	35	14	11	21
3760	10	13	11	9	8	15	31	12	12	23	4115	10	11	9	7	8	17	32	12	10	22
3761	11	11	11	12	8	15	32	13	11	21	4129	11	13	11	7	10	13	33	15	10	23
3762	12	11	9	9	11	16	34	13	10	17	4130	11	12	9	10	11	16	34	14	10	21
3763	12	8.3	9	9	11	13	32	14	10	20	4139	10	11	11	10	11	14	33	12	11	20
3764	10	11	12	10	12	15	33	13	10	20	4147	11	11	9	7	6	15	32	15	11	20
3765	12	11	11	10	10	14	33	13	10	22	4149	12	11	9	7	12	15	31	13	9	21
3766	11	8.3	9	11	10	15	28	15	10	20	4150	11	8.3	9	11	8	14	31	13	10	20
3767	10	11	9	7	6	13	34	13	10	23	4154	12	8.3	9	9	6	15	33	13	10	17
3768	10	13	9	9	6	16	33	12	10	20	4156	10	12	9	7	9	15	33	14	11	20
3775	12	8.3	11	11	10	16	31	14	11	21	4157	11	13	11	7	8	15	31	13	10	20
3776	10	11	9	9	8	14	36	15	10	21	4158	10	12	11	7	12	15	32	13	11	20
3777	10	12	10	11	8	14	33	14	11	20	4159	10	13	11	11	11	16	29	12	12	22
3778	10	11	9	10	8	15	32	14	10	20	4165	9	12	11	7	10	16	32	13	11	21
3779	10	12	9	10	10	14	33	13	10	21	4181	11	8.3	9	12	10	15	33	13	10	22
3780	12	13	11	9	12	15	33	13	10	21	4186	11	13	10	11	8	14	32	14	10	20
3781	11	8.3	10	9	11	16	33	13	11	15	4190	12	8.3	9	7	11	14	31	15	11	21
3782	10	8.3	11	9	8	14	32	13	10	20	4221	10	12	11	11	12	14	35	13	10	22
3783	10	11	10	12	9	15	32	13	12	20	4222	12	8.3	9	9	6	14	36	12	11	22
3784	12	11	11	7	11	13	33	14	11	16	4236	12	14	9	11	8	14	32	15	12	21
3785	11	11	9	9	10	15	34	13	11	20	4608	10	11	9	8	8	15	33	15	10	23
3786	11	12	11	9	8	16	33	15	12	20	4609	10	12	9	7	6	15	34	12	12	20
3787	12	8.3	9	7	9	16	32	13	12	22	4610	10	12	9	11	8	14	32	15	12	20
3788	11	11	9	10	10	16	31	15	12	20	4611	12	8.3	9	11	10	14	31	15	11	21
3789	12	12	9	12	10	16	32	15	11	22											

Haplótipos de 10 X-STR (Decaplex X) de indivíduos “normais”

Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789
A001	10	12	9	11	6	15	34	14	12	21	A164	11	12	11	7	6	14	33	13	12	22
A002	11	8.3	11	11	12	14	33	14	11	20	A165	11	13	11	10	12	13	34	16	11	20
A003	13	8.3	11	7	10	14	29	14	11	20	A167	10	8.3	12	11	8	15	34	15	10	22
A004	13	8.3	11	11	10	14	32	13	11	22	A168	11	11	10	10	8	16	31	15	11	20
A005	12	15	9	12	11	13	34	15	10	21	A169	12	12	10	12	10	13	33	16	12	20
A006	11	13	11	12	11	16	31	13	11	22	A170	10	8.3	9	9	8	16	32	14	11	20
A007	11	13	9	9	10	15	32	13	10	21	A171	11	12	10	11	9	14	33	15	12	16
A008	10	8.3	11	11	6	16	27	14	9	15	A172	10	9	9	7	10	14	33	14	11	20
A009	11	8.3	9	7	8	16	33	14	11	20	A173	11	12	11	10	9	16	32	13	12	21
A010	12	11	10	9	11	14	31	14	9	20	A174	10	13	9	11	10	15	33	13	11	20
A011	10	11	11	11	11	14	31	13	11	20	A175	12	11	9	11	8	16	34	13	10	20
A012	12	12	11	10	11	15	29	12	10	23	A176	10	8.3	11	11	8	13	34	13	12	21
A013	11	8.3	11	11	11	14	31	14	12	21	A177	10	8.3	9	10	10	13	33	13	10	20
A014	13	12	12	11	6	15	33	13	10	23	A179	11	8.3	9	11	8	13	32	12	11	21
A015	12	14	11	11	8	14	31	14	10	20	A180	10	8.3	12	10	6	17	34	14	11	20
A016	10	11	10	12	10	15	32	12	11	22	A181	12	8.3	10	11	8	15	35	13	12	20
A017	10	8.3	10	9	11	14	34	14	11	20	A182	10	13	9	7	12	15	31	15	11	15
A018	12	11	11	9	11	14	31	13	11	19	A183	11	11	9	11	11	15	35	14	10	23
A019	10	12	11	7	10	14	34	14	12	23	A184	11	13	9	11	11	15	30	16	11	20
A020	12	12	11	11	6	14	31	12	11	15	A185	11	12	11	8	10	15	31	14	11	20
A021	11	12	11	10	6	16	35	12	12	20	A186	12	11	9	9	6	15	31	13	11	20
A022	12	8.3	9	7	12	15	33	12	12	21	A187	12	8.3	9	12	11	14	31	12	11	23
A023	12	12	9	9	6	14	33	14	10	20	A188	12	11	11	11	9	15	35	14	10	21
A024	11	8.3	9	9	8	15	32	14	13	22	A190	11	8.3	9	9	10	14	33	14	11	20
A025	10	13	9	12	6	15	34	15	11	21	A191	11	8.3	9	9	10	15	31	14	10	22
A026	9	12	9	12	10	16	34	15	11	16	A192	11	12	9	10	11	15	32	14	12	21
A027	11	11	9	9	9	15	31	15	10	21	A193	12	13	9	12	10	15	33	14	12	21
A028	13	11	11	10	12	14	31	15	12	22	A194	12	12	11	12	10	16	35	16	10	20
A029	11	8.3	10	12	8	13	32	15	12	22	A195	11	13	12	7	10	14	32	13	10	20
A030	10	13	9	7	10	17	32	13	11	15	A196	11	12	9	9	11	14	34	12	11	22
A031	11	8.3	11	7	8	16	33	16	12	20	A197	11	8.3	9	7	6	15	30	13	10	21
A032	10	12	9	7	10	15	31	14	10	21	A198	11	13	11	9	8	14	35	13	10	20
A033	10	13	11	9	10	15	32	14	11	16	A199	12	12	11	11	9	15	34	15	10	15
A034	10	8.3	9	9	8	15	33	12	12	20	A200	11	12	10	9	10	14	31	13	12	15
A035	12	11	11	9	8	15	35	14	10	21	A201	12	13	12	11	10	14	31	14	10	20
A036	11	8.3	11	11	10	14	30	15	10	20	A202	11	12	10	11	6	15	33	14	10	21
A037	11	13	9	11	9	14	35	16	11	20	A203	11	11	10	11	12	15	31	13	12	23
A038	10	8.3	10	7	11	14	34	14	12	22	A204	10	8.3	9	10	12	15	33	12	11	20
A039	11	13	9	11	8	16	35	14	9	21	A206	12	12	9	9	12	15	33	12	12	20
A040	11	11	11	9	11	15	30	13	11	20	A207	10	8.3	9	9	6	15	34	12	12	21
A041	10	12	11	11	12	15	31	14	11	20	A208	10	12	9	11	6	14	33	16	11	21
A042	13	11	10	11	11	15	31	12	12	22	A209	12	8.3	9	12	10	14	30	14	11	20
A043	10	13	9	10	11	16	32	14	11	21	A210	11	12	9	7	11	15	33	14	11	21
A044	12	12	9	9	10	17	32	14	11	20	A211	11	8.3	9	7	8	15	33	18	10	23
A045	12	13	11	11	12	16	32	15	12	20	A212	10	11	12	10	10	15	35	14	10	23
A046	12	8.3	9	12	6	15	33	15	10	21	A213	11	13	9	11	10	15	35	12	11	20

Continua

Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789
A047	11	13	9	11	10	14	35	13	11	21	A214	10	12	10	10	11	15	34	14	10	22
A048	10	13	11	11	8	15	32	13	11	20	A215	12	8.3	10	11	6	14	33	14	11	20
A049	12	8.3	11	11	10	16	35	14	11	20	A216	11	13	9	10	6	14	31	14	12	21
A050	12	11	11	7	11	14	32	12	10	15	A217	11	12	11	12	9	15	33	14	11	21
A051	10	13	11	7	12	14	36	14	10	20	A218	12	13	11	11	10	14	31	15	11	21
A052	9	12	9	9	10	17	33	13	12	15	A219	11	8.3	9	11	6	14	35	14	11	15
A053	11	12	9	11	11	15	33	12	11	22	A220	10	12	9	7	8	14	32	13	12	20
A054	11	12	10	9	11	16	34	14	12	20	A221	12	11	11	7	10	13	29	17	11	22
A055	10	8.3	11	11	9	15	31	13	12	20	A223	11	8.3	10	7	12	15	34	16	10	21
A056	10	8.3	11	10	11	15	34	14	11	19	A224	10	13	11	7	6	16	32	15	12	22
A057	11	13	11	9	6	14	31	15	10	22	A225	11	13	9	7	10	15	34	12	10	21
A058	10	13	10	11	10	14	33	13	13	22	A226	10	12	11	12	8	17	33	14	11	20
A059	11	12	10	12	11	16	33	15	9	23	A227	9	11	9	11	10	15	32	12	12	22
A060	12	15	10	9	6	16	33	13	10	20	A229	11	13	11	7	11	15	33	15	12	22
A061	11	8.3	10	11	11	15	33	13	11	20	A230	11	13	10	7	6	14	33	13	10	23
A062	12	11	9	12	6	17	27	13	11	20	A231	10	11	9	7	12	15	35	14	12	22
A063	11	12	11	7	11	16	36	13	10	20	A232	10	14	11	9	8	16	31	15	11	16
A064	12	8.3	9	9	8	15	34	13	10	15	A233	10	12	11	11	10	14	33	14	11	19
A065	11	12	9	7	8	16	31	13	10	22	A234	11	13	11	11	12	16	34	14	12	17
A066	13	8.3	9	11	8	16	31	14	12	20	A235	10	11	9	7	6	16	33	14	11	21
A067	11	8.3	11	7	10	15	33	15	10	20	A236	12	12	9	10	6	15	32	12	12	22
A068	10	14	11	11	11	15	36	12	11	23	A237	12	8.3	9	12	10	16	35	13	12	20
A069	10	13	9	7	9	16	35	12	12	21	A238	11	8.3	11	9	12	14	34	14	10	20
A070	11	12	9	11	11	16	33	15	10	15	A239	12	13	9	7	6	15	34	13	11	20
A071	10	12	11	12	8	14	34	15	12	23	A240	10	12	10	8	10	14	30	14	11	21
A072	12	14	9	9	10	13	33	14	11	20	A241	10	14	9	9	10	15	31	12	12	23
A073	12	8.3	11	11	10	16	30	14	10	21	A242	11	12	11	9	8	14	31	14	12	20
A074	10	12	10	7	9	13	30	15	11	21	A243	10	8.3	9	9	11	16	34	16	10	21
A075	14	12	11	10	12	14	31	14	10	20	A244	12	11	12	7	10	15	31	14	11	21
A076	11	12	9	12	10	15	34	11	10	20	A245	10	11	10	11	6	16	31	15	11	20
A077	10	8.3	11	11	12	15	33	12	11	21	A246	11	13	9	12	12	15	34	14	9	22
A078	11	13	11	10	11	14	35	13	11	20	A247	10	13	13	9	11	14	33	13	10	22
A079	12	11	11	9	10	14	29	14	12	20	A249	12	12	10	7	11	14	31	15	10	20
A080	10	13	11	7	10	16	31	14	10	22	A250	12	14	9	12	10	16	33	14	12	20
A081	12	11	11	9	11	15	32	13	10	20	A251	12	12	11	10	11	14	33	15	12	20
A082	13	12	11	10	10	16	33	12	11	20	A252	10	12	11	11	6	13	32	15	11	18
A083	10	11	9	10	11	13	33	15	11	20	A253	10	12	11	10	8	14	31	14	8	23
A084	10	8.3	10	10	10	15	33	12	12	20	A254	12	13	9	9	8	13	35	13	11	21
A085	11	12	10	7	11	16	33	15	12	24	A255	10	12	11	11	10	14	38	13	10	21
A086	12	12	9	9	6	14	31	15	11	22	A256	10	8.3	11	7	12	15	33	12	11	20
A087	12	11	9	10	11	15	29	12	11	20	A257	10	13	11	11	8	14	37	12	11	22
A088	10	12	11	12	6	16	35	15	10	16	A258	11	13	9	11	6	13	34	13	12	23
A090	12	14	11	7	6	16	32	13	10	20	A259	11	12	12	10	8	14	31	14	12	22
A091	9	11	10	9	10	16	31	15	11	20	A260	11	11	9	9	6	16	36	15	11	20
A092	10	8.3	11	10	13	14	35	14	11	20	A261	12	8.3	11	10	8	15	35	17	11	21
A093	10	12	11	9	6	15	32	13	10	22	A262	13	8.3	10	11	8	15	30	14	10	20
A094	11	11	9	11	9	14	31	14	11	22	A263	10	8.3	11	7	8	15	33	13	10	20
A095	12	13	11	9	8	16	34	12	9	20	A264	12	12	9	7	6	15	29	15	11	22

Continua

Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789
A096	10	8.3	11	11	10	16	32	14	11	20	A265	12	14	9	10	6	14	32	15	10	21
A097	12	14	11	11	8	14	33	14	10	21	A266	11	8.3	11	12	11	15	33	14	9	22
A098	10	11	10	9	9	14	36	16	11	15	A267	11	8.3	11	11	6	14	30	12	11	21
A099	11	13	10	11	11	15	32	13	11	21	A268	11	12	12	12	11	16	34	12	11	23
A100	11	12	9	7	11	15	34	13	10	20	A269	11	8.3	11	10	11	16	35	14	13	22
A101	10	12	11	9	6	14	32	13	11	21	A270	11	12	9	7	6	16	30	13	10	21
A102	12	13	9	12	10	15	34	15	12	22	A271	9	8.3	9	11	6	15	35	12	10	20
A103	12	8.3	9	7	10	15	32	13	10	22	A272	12	8.3	11	7	10	16	32	13	11	21
A104	10	11	10	12	11	14	34	15	10	20	A273	12	13	9	10	6	15	33	13	10	21
A105	11	8.3	10	11	12	16	34	14	11	20	A274	12	13	10	11	12	15	33	12	11	23
A106	11	12	9	10	8	15	35	17	11	21	A275	11	14	10	9	11	15	33	14	11	21
A107	10	12	9	12	10	16	27	12	12	20	A276	11	8.3	11	11	10	15	32	14	10	20
A108	12	11	9	12	10	15	33	14	12	24	A277	11	8.3	11	8	10	14	33	11	12	20
A109	11	12	9	11	10	14	32	14	12	21	A278	10	13	9	7	8	14	34	13	12	20
A110	12	12	11	8	8	15	34	13	10	22	A279	12	12	12	10	11	17	31	13	10	22
A111	10	11	11	8	8	14	31	13	11	20	A280	10	11	10	9	6	16	33	13	12	21
A112	12	11	9	7	9	13	31	15	11	22	A281	10	12	9	9	10	15	32	13	10	15
A113	12	13	9	12	12	15	31	14	11	23	A282	12	12	9	11	8	14	34	13	12	15
A114	10	12	9	11	9	14	37	13	10	20	A283	12	12	9	10	11	13	33	13	11	15
A115	12	8.3	11	10	11	13	32	13	10	21	A284	11	12	13	10	10	15	33	14	12	20
A116	10	12	11	7	10	15	35	14	11	22	A285	10	12	10	7	10	14	35	14	12	22
A117	11	12	11	12	11	14	30	13	11	21	A286	10	11	11	10	8	15	33	13	11	20
A118	12	8.3	9	7	8	14	34	12	10	21	A288	11	14	9	10	8	14	38	14	10	16
A119	11	12	9	12	9	16	33	14	11	20	A289	10	8.3	9	9	6	15	30	12	10	21
A120	11	12	11	10	10	14	31	13	11	20	A291	10	8.3	11	10	11	16	33	12	10	21
A121	11	11	10	9	10	14	33	14	11	23	A292	11	13	11	9	6	14	31	13	10	20
A122	11	12	10	7	11	16	32	14	12	22	A293	12	11	9	11	10	15	31	12	12	21
A123	11	8.3	10	12	6	15	34	14	12	22	A294	11	12	11	10	10	16	35	11	11	20
A124	11	12	9	7	10	13	33	15	11	22	A295	11	11	11	11	9	16	30	14	12	21
A125	11	12	9	11	6	14	33	13	12	20	A296	10	12	9	9	6	15	35	15	11	20
A126	12	12	10	7	9	15	32	15	8	16	A297	11	12	11	11	10	14	34	14	11	21
A127	12	12	10	10	6	13	32	12	11	20	A298	12	12	11	12	8	16	31	15	11	22
A128	10	13	9	11	11	16	36	14	10	21	A299	10	13	11	9	6	14	33	14	11	16
A130	10	8.3	12	12	11	15	31	14	12	20	A300	10	13	11	12	11	14	33	12	11	22
A131	10	13	10	7	8	15	31	13	10	21	A301	10	13	10	7	11	15	32	15	10	16
A132	11	12	12	10	12	15	33	12	12	21	A302	10	8.3	9	9	8	14	32	13	10	23
A133	11	8.3	9	11	11	15	33	13	10	20	A303	12	13	10	12	6	15	33	13	11	17
A134	11	8.3	9	11	11	14	27	14	10	21	A304	10	13	11	7	8	15	33	15	12	20
A135	11	8.3	9	11	10	14	34	15	12	15	A305	11	11	10	11	10	15	33	15	10	20
A136	10	11	12	7	12	15	32	14	12	21	A306	12	12	13	9	8	15	35	14	11	23
A137	11	11	9	11	10	14	34	12	11	20	A307	11	11	11	10	6	13	31	13	13	22
A138	12	8.3	9	9	10	15	31	15	11	20	A308	10	11	9	11	11	15	34	14	10	20
A139	12	12	11	7	6	14	36	14	10	21	A309	11	11	11	7	11	14	31	13	11	23
A141	11	14	9	9	11	14	31	14	13	20	A310	10	11	12	11	11	16	32	14	11	23
A142	11	8.3	9	8	11	15	33	13	10	16	A311	11	12	9	8	11	17	33	14	12	23
A143	10	11	11	9	10	16	33	14	10	23	A312	13	12	10	7	10	17	36	14	11	20
A144	12	8.3	9	11	11	16	33	13	10	20	A313	12	12	10	7	10	15	33	14	10	23
A145	10	13	9	6	10	14	34	13	12	20	A314	10	13	11	9	9	14	33	13	11	20

Continua

Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	Amostra	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789
A146	10	11	9	10	10	16	33	14	11	21	A315	10	13	9	11	12	15	36	14	12	20
A147	10	11	9	11	10	15	33	15	11	23	A316	10	11	11	10	6	14	31	14	11	21
A148	12	12	11	7	10	14	32	14	12	20	A317	11	12	11	10	12	16	32	15	11	21
A150	10	8.3	11	7	10	14	35	13	11	20	A318	11	14	10	9	10	14	31	13	11	20
A151	12	8.3	11	12	6	15	28	13	10	21	A319	10	13	9	7	10	15	33	161	10	20
A152	11	8.3	9	11	6	15	31	15	12	20	A320	11	12	10	11	10	15	32	14	10	20
A154	10	8.3	11	7	11	13	33	13	10	20	A321	11	11	11	10	10	15	36	14	12	22
A155	12	13	10	11	11	15	34	12	11	22	A322	11	8.3	10	11	11	14	32	14	10	20
A156	11	11	9	12	11	14	33	12	12	20	A323	11	8.3	11	9	12	15	33	13	11	20
A157	12	12	11	11	9	16	34	13	11	20	A324	10	8.3	10	9	8	14	34	14	10	22
A158	12	12	10	10	9	16	31	14	10	21	A325	12	12	12	12	6	14	33	12	11	21
A159	10	12	11	12	10	14	31	12	10	20	A326	12	11	11	7	8	16	32	13	11	20
A160	11	11	9	11	8	14	31	15	10	22	A327	11	14	9	10	10	14	32	12	10	20
A161	10	12	9	10	6	16	32	15	12	21	A328	12	12	9	7	6	14	29	15	10	15
A162	12	14	11	12	10	14	35	14	9	20	A376	11	14	9	11	10	14	33	14	9	20
A163	11	8.3	9	11	12	16	31	14	11	22											

DXS9902

A figura 8 e a figura 9 representam o resultado da sequenciação de uma amostra que possui uma adenina antes do motivo de repetição. A inserção foi confirmada através da sequenciação da cadeia menos de DNA. O motivo de repetição para o *locus* em causa (DXS9902) é GATA.

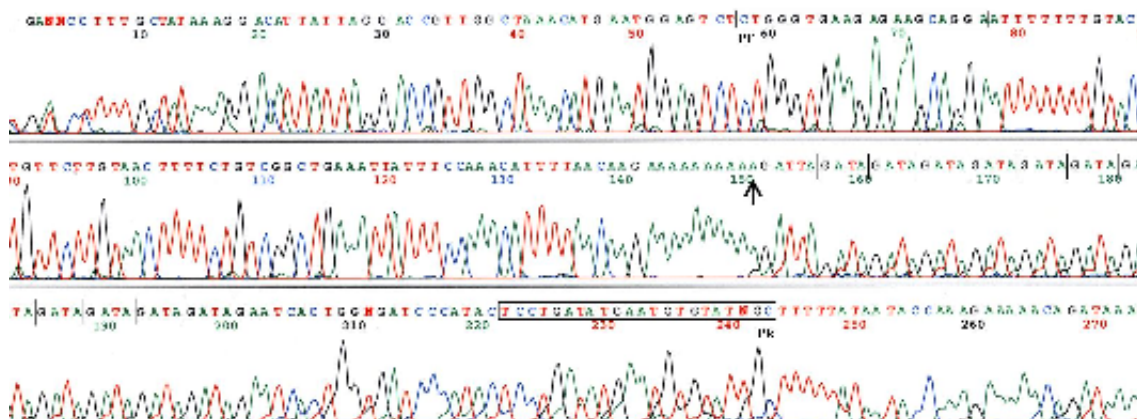


Figura 8 - Sequência da cadeia mais de DNA de uma amostra com inserção de uma adenina (indicada com uma seta) antes do motivo de repetição (GATA) para o *locus* DXS9902. A sequência de repetição encontra-se marcada entre traços. PF – *primer forward*; PR – *primer reverse*.

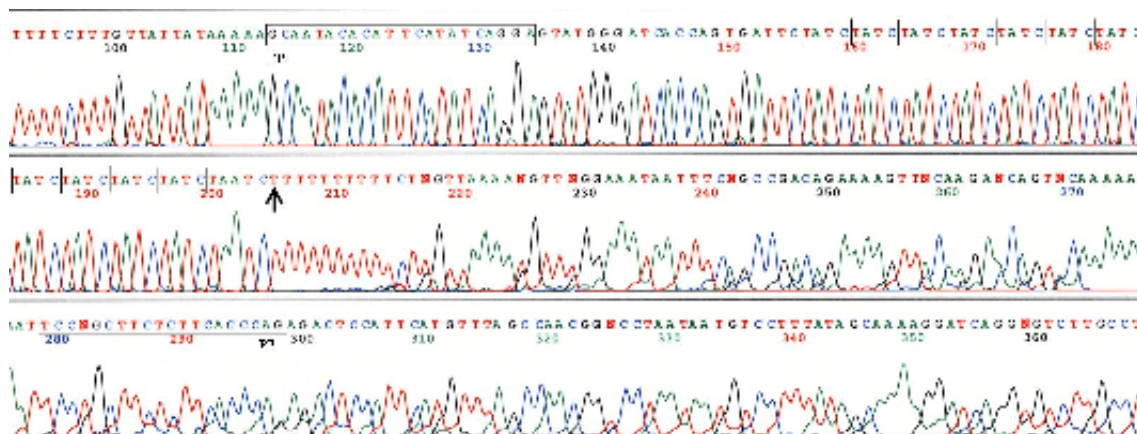


Figura 9 - Sequência da cadeia menos de DNA de uma amostra com inserção de uma timina (indicada com uma seta) antes do motivo de repetição (GATA) para o *locus* DXS9902. A sequência de repetição encontra-se marcada entre traços. PF – *primer forward*; PR – *primer reverse*.

DXS9898

A figura 10 e a figura 11 representam o resultado da sequenciação da amostra 3781. Esta amostra possui um motivo de repetição incompleto sendo este, um motivo de repetição complexo [(TATC)₂-(ATC)-(TATC)_n] e uma *deleção* de uma timina após este

motivo de repetição. A amostra neste caso tem 8.3 repetições. A figura 12 e a figura 13 representam o resultado da sequenciação de uma amostra que não tem *deleções* nos motivos de repetição (possui 9 repetições). Tal como no caso anterior, as alterações foram confirmadas através da análise da cadeia complementar.

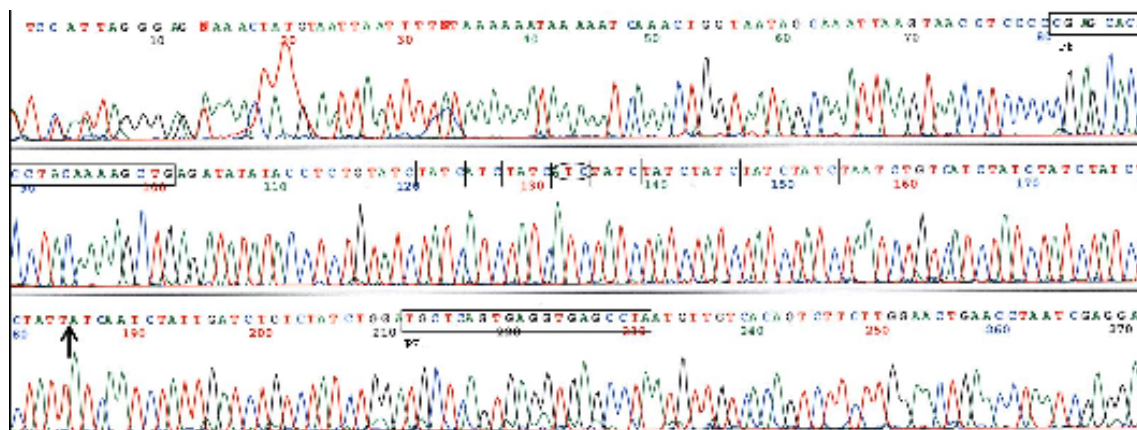


Figura 10 - Sequência da cadeia mais de DNA da amostra 3781 com um motivo de repetição incompleto (assinalado com uma elipse) para o locus DXS9898 e com a *deleção* de uma timina após este motivo (local assinalado com uma seta). A sequência de repetição encontra-se marcada entre traços. A amostra é genotipada como 8.3. PF – *primer forward*; PR – *primer reverse*.

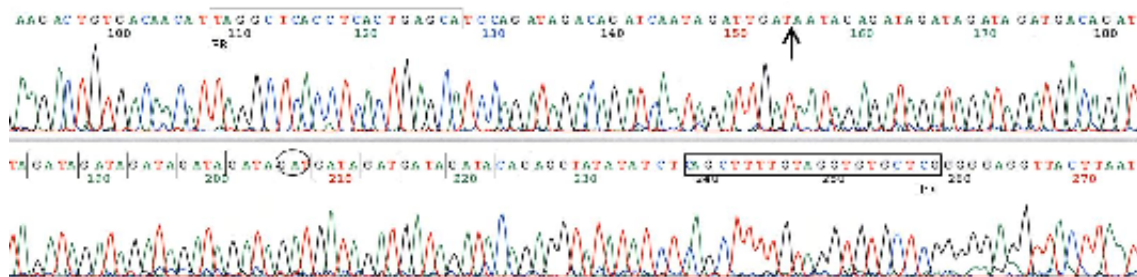


Figura 11 - Sequência da cadeia menos de DNA da amostra 3781 com um motivo de repetição incompleto (assinalado com uma elipse) para o locus DXS9898 e com a *deleção* de uma timina após este motivo (local assinalado com uma seta). A sequência de repetição encontra-se marcada entre traços. A amostra é genotipada como 8.3. PF – *primer forward*; PR – *primer reverse*.

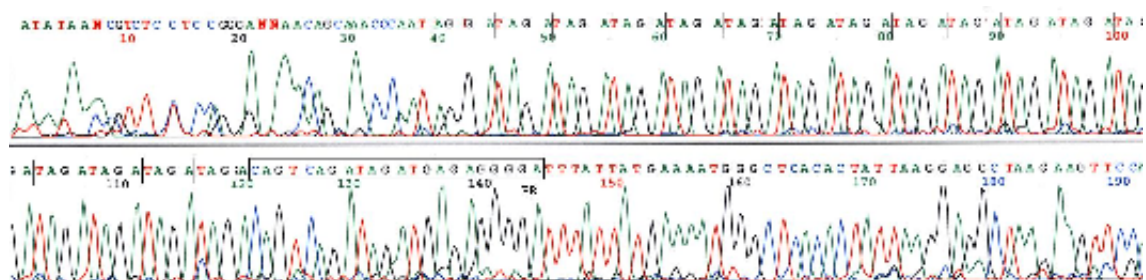


Figura 14 - Sequência da cadeia mais de DNA de uma amostra sem motivos de repetição incompletos para o locus DXS7132. A sequência de repetição encontra-se marcada entre traços. A amostra é genotipada como 16. PR – *primer reverse*

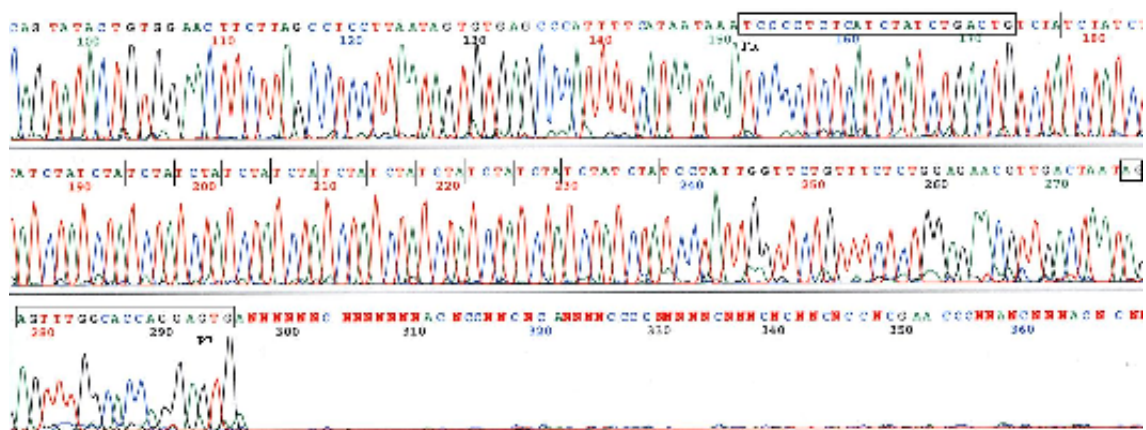


Figura 15 - Sequência da cadeia menos de DNA de uma amostra sem motivos de repetição incompletos para o locus DXS7132. A sequência de repetição encontra-se marcada entre traços. A amostra é genotipada como 16. PF – *primer forward*; PR – *primer reverse*.

Anexo IV – Poster 1

Poster apresentado no III Mediterranean Academy of Forensic Sciences Congress, V Latin-American Congress of Medical Law, III Iberian Congress of Legal Medicine (21-23 de Junho de 2007, Porto, Portugal).

High frequency of interalleles in a STR polymorphism included in AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Y-File $^{\text{TM}}$ observed in prostate cancer patients

Carvalho R.¹, Pinheiro M.F.^{2,3,4} Medeiros R.^{3,4,5}

¹MS student in Forensic Sciences - Universidade do Porto; ² Instituto Nacional de Medicina Legal – Delegação do Porto; ³Universidade Fernando Pessoa; ⁴Instituto de Ciências Biomédicas de "Abel Salazar"; ⁵Unidade de Oncologia Molecular – I.P.O. Porto

Background

Prostate cancer is the most frequent cancer among men in most developed countries, yet little is known about its causes. Older age, African ancestry and a positive family history of prostate cancer have long been recognized as important risk factors [1]. Although the prognostic relevance of genetic alterations on chromosome Y is not known, the loss of Y chromosome material is reported as one of the most common aberrations in prostate cancer, like loss of Y-chromosome-specific genes [2].

A Japanese study of DYS19 of males with and without prostate cancer showed that males with a specific allele are more susceptible to develop prostate cancer than males with other alleles [3].

In this study we performed Y-chromosomal analysis with short tandem repeats (STR) used in the forensic field since this type of polymorphism has already demonstrated to be a good tool to rapidly scan genomes looking for loci somehow related to some diseases. Such use must be recognised at the outset of the use of such systems [4].

STR linked to diseases fall into one of two categories; an individual STR may occupy a position close to a particular gene responsible for a genetic disorder, and may therefore be used to follow the progress of the diseased gene within a family; it would not be possible to make any conclusions about the disease status of an individual in isolation of information about the pedigree. More rarely, an STR may be directly responsible for a genetic disease (e.g. Huntingtons disease, fragile X syndrome, myotonic muscular dystrophy) or display an allele(s) directly associated with a disease within a given population. Use of STRs from the latter group should ideally be avoided [4].

Aim

Scan genomic DNA from patients with prostate cancer in comparison with normal controls using AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Y-File $^{\text{TM}}$

Material and Methods

In this study, 282 unrelated males with prostate cancer and 175 apparently healthy and unrelated males were analysed with AmpF ℓ STR $^{\text{®}}$ Y-File $^{\text{TM}}$ kit. Samples were analysed in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyser with a 36 cm array and POP-4 polymer. Fragment sizes were determined automatically using Genescan Analysis Software v3.7 (Applied Biosystems) and allele designation was made by comparison with allelic ladder included in the kit with Genotyper 3.7 Softwares (Applied Biosystems). Statistical analysis was performed using SPSS for a significant level of 95%.

Results and Discussion

Our preliminary results demonstrate that interalleles are over represented in prostate cancer cases for DYS458 (table 1). We hypothesize that interalleles could be considered as a putative risk factor for this disease ($p=0,026$).

Table 1: frequency of interalleles in males with or without prostate cancer

	Presence of interalleles	Absence of interalleles
Prostate Cancer	8 (2,8%)	281 (97,2%)
Controls	0 (0%)	175 (100%)

STR DYS458 is located at Yp11.2 (figure 1) just like some genes that could play a role in prostate cancer progression - TSPY (Testis specific protein) and PRKY (Protein kinase) – since they have aberrant expression in prostate cancer cell lines [5,6].

The position at Y chromosome shows that PRKY (7291880-7291918) is near DYS458 (7911191-7911322) [7]. Some authors have demonstrated that some STR replacements in untranslated sequences (UTR) and introns play a role in prostate disease since they change gene expression [8]. The same mechanism could happen for STR in non-coding regions like this one and others used in the forensic field.

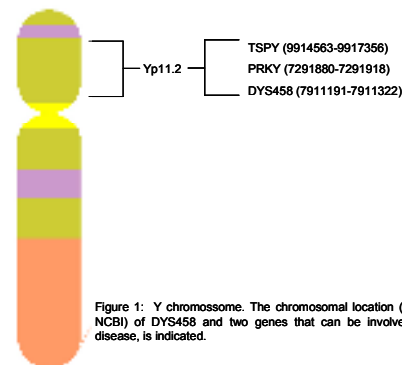


Figure 1: Y chromosome. The chromosomal location (searched on NCBI) of DYS458 and two genes that can be involved in cancer disease, is indicated.

Conclusions

Further studies will be performed to evaluate this finding, including allele sequencing. Moreover, it remains to understand the real meaning of interalleles in the development and behaviour of this disease.

1 - Schaid DJ, 2004, "The complex genetic epidemiology of prostate cancer", *Human Molecular Genetics*, 2004, Vol. 13, Review Issue 1, R103-R121;

2 - Perinicherry G, Sasaki M, Angan A, Kumar V, Carrol P, Dahiya R, 2000, "Deletion of Y-Chromosome specific genes in human prostate cancer", *The Journal of Urology*, Vol. 163, p1339;

3 - Ellis AA, Lee J, Naroda T, Sasahara K, Sano T, Kagawa S, Iwamoto T, Nakahori Y, 2002, "Linkage between prostate cancer incidence of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19", *J. Med. Invest.*, 49 (1-2), 56-60

4 - Kington C, Gill P, D'Aljab E, Andersen JF, Bar W, et al., 1995, "Report on the second EDNAP collaborative STR exercise", *Forensic Science International*, 71, p137;

5 - Lau Y. C., Zhang J., 2000, "Expression analysis of thirty one Y chromosome genes in human prostate cancer", *Molecular Carcinogenesis*, 27:308-321

6 - Dasari V.K., Goharderakhsan R.Z., Perinicherry G., Li L.C., Tanaka Y., Alonzo J., Dahiya R., 2001, "Expression analysis of Y chromosome genes in human prostate cancer", *The Journal of Urology*, Vol.165, 1355-1341

7 - Hanson E.K., Ballantyne J., 2006, "Comprehensive annotated STR physical map of the human Y chromosome: Forensic implications", *Legal Medicine* 8, 110-120

8 - Riley D.E., Krieger J.N., 2005, "Short tandem repeat (STR) replacements in UTRs and introns suggest an important role for certain STRs in gene expression and disease", *Gene* 344, 203-211

Anexo V – Poster 2

Poster apresentado no 22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics (22-25 de Agosto de 2007, Copenhaga, Dinamarca).

Study of 16 X-STRs in a prostate cancer population sample (Preliminary study)

Carvalho R.¹, Pinheiro M.F.^{2,3,4} Medeiros R.^{3,4,5}

¹MS student in Forensic Sciences - Universidade do Porto, Portugal; ² Instituto Nacional de Medicina Legal – Delegação do Norte, Portugal; ³Universidade Fernando Pessoa, Portugal; ⁴Instituto de Ciências Biomédicas de "Abel Salazar", Portugal; ⁵Grupo de Oncologia Molecular – I.P.O. Porto, Portugal

Background

Prostate cancer is the most frequent cancer among men in developed countries, yet little is known about its causes. Older age, African ancestry and a positive family history of prostate cancer have long been recognized as important risk factors [1].

On the basis of studies of prostate cancer risk in relatives of affected men, it has been suggested that an hereditary prostate cancer susceptibility locus may reside on the X chromosome. Several population-based studies have reported a statistically significant excess risk of prostate cancer in men with affected brothers, as compared with those with affected fathers, consistent with the hypothesis of an X-linked, or recessive, model of inheritance [2]. Linkage analysis may help to find genetic susceptibility genes for prostate cancer. An advantage of linkage studies is that the entire genome can be screened in an efficient manner, using genetic markers (usually short tandem repeats) to search for regions that show excessive sharing of inherited alleles among affected men [1]. For the EDNAP (European DNA profiling group), it is likely that many or possibly most STRs will eventually be shown to be useful in following a genetic disease or other genetic trait within a family and therefore this possibility must be recognised at the outset of the use of such systems [3].

Xu et al. found a prostate cancer susceptibility gene on the X-chromosome (DXS1113; DXS1227 and DXS297 – Xq27-28) in a population of 360 prostate cancer families [2]. More recently these same authors confirmed this hypothesis [4].

Aim

Scan genomic DNA from patients with prostate cancer in comparison with normal controls using Argus X-8 (Biotype®) and a new decaplex used in a collaborative study of GEP-ISFG.

Material and Methods

In this study, DNA samples from 282 unrelated males with prostate cancer and 101 apparently healthy and unrelated males were analysed with Argus X-8 and 77 with Decaplex-X. Samples were analysed in an ABI PRISM 310 or in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyser with POP-4 polymer. Fragment sizes were determined automatically using Genescan Analysis Software v3.7 (Applied Biosystems) and allele designation was made by comparison with allelic ladder included in Argus X-8 kit with Genotyper 3.7 Softwares (Applied Biosystems). For Decaplex-X, allelic designation was made by comparison with 9974A. Statistical analysis was performed using SPSS for a significant level of 95%.

Results and Discussion

In this preliminary study, we found a correlation between some alleles of different loci and prostate cancer.

Analysis of allele distribution in loci from Argus X-8 revealed that some alleles of DXS10134 and DXS10101 (allele 37 and 30.1 respectively) could be implicated in prostate cancer prognosis (table 1). The same happened with loci DXS7133 and GATA32D05 of Decaplex (table 2).

According with our results, a male carrying allele 37 of DXS10134 has a higher risk of developing prostate cancer than a male with other allele. On the other hand, we do not find any male with allele 30.1 in prostate population, indicating that males with this allele could be protected against prostate cancer (table 1). This protective effect also occurred for allele 11 of DXS7133 and GATA31E08 (table 2).

Table 1: Number of males with determined allele, p values and OR (odds ratio) for Argus X-8 loci with statistical relevance. * when p<0,005

Locus	Allele	Normal	Prostate Cancer	p	OR
DXS7423	14	23	89	0,091	1,57 (0,90 – 2,76)
DXS10134	37	7	45	0,022*	2,56 (1,06 – 6,46)
DXS10101	28.2	7	36	0,108	
	30.1	13	0	0,000*	-
	30.2	7	34	0,150	1,85 (0,75 – 4,75)
	32.2	7	11	0,219	0,55 (0,19 – 1,61)

Table 2: Number of males with determined allele, p values and OR (odds ratio) for Decaplex loci with statistical relevance. * when p<0,005

Locus	Allele	Normal	Prostate Cancer	p	OR
DXS7133	9	29	125	0,154	1,46 (0,84 – 2,53)
	10	11	46	0,540	1,25 (0,58 – 2,72)
	11	36	82	0,002*	0,44 (0,25 – 0,78)
GATA31E08	7	13	69	0,121	1,67 (0,83 – 3,41)
	9	19	43	0,072	0,57 (0,30 – 1,11)
	11	24	71	0,377	0,78 (0,43 – 1,41)
GATA172D05	11	22	41	0,006*	0,44 (0,23 – 0,84)
DXS7132	14	27	78	0,280	0,74 (0,42 – 1,32)

Table 3: Chromosomal position of some loci.

Locus	Chromosomal position
DXS10134	Xq28.3
DXS10135	Xq26
DXS7133	Xq22
GATA172D05	Xq26-27

Conclusions

- In this preliminary study we found correlation between alleles of some loci used in forensic casework and prostate cancer.
- Population control will be increased since in this study the sample is small (only 101 males for Argus X-8 and 77 males for Decaplex).
- Prostate cancer population will also be increased for Argus X-8 to see if allele 30.1 of DXS10101 maintains this high protective effect that we found.
- Linkage studies will be performed to search for candidate genes because other studies have already demonstrated that these X regions (table 3) are involved in aberrant gene expression in prostate cancer [5-7]. Different alleles could lead to different gene expression patterns.

1 - Schaid DJ, 2004, "The complex genetic epidemiology of prostate cancer", *Human Molecular Genetics*, 2004, Vol. 13, Review Issue 1, R103-R121;

2 - Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K et al, 1998, "Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome", *Nature Genetics*, Vol. 20, p.175 ;

3 - Kimpton C, Gill P, D'Aloja E, Andersen JF, Bar W, et al, 1995, "Report on the second EDNAP collaborative STR exercise", *Forensic Science International*, 71, p137;

4 - Gillanders EM, Xu J, Chang B, Lange EM, Wiklund F, et al, 2004, "Combined Genome-Wide Scan for Prostate Cancer Susceptibility Genes", *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 96, No. 16, August 18, p1240

5 - HP Sattler, V Rhode, H Bonkhoff, T Zwegler, B Wulfvh. Comparative genomic Hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. The prostate (1999) 39:79-86

6 - GV Glinisky, A Krones-Herzig, AB Glinisky. Malignancy-associated regions of transcriptional activation: gene expression profiling identifies common chromosomal regions of a recurrent transcriptional activation in human prostate, breast, ovarian, and colon cancer. *Human Prostate* (2003) Vol. 5 No. 3, p218-228

7 - DA Stephan, GR Howell, TM Teslovich, AJ Coffey, L Smith, JE Bailey-Wilson, L Malechek, D Gildea, JR Smith, EM Gillanders, J Schleutker, P Hu, HE Stelnguber, P Dhami, CM Robbins, I Makalowska, JD Carpten, R Sood, S Mumm, R Reinhold, TI Bonner, A Balfio-Bonnie, L Bubendorf, M Heiskanen, OP Kallioneimi, AD Baxevanis, SS Joseph, I Zucchi, RD Burk, W Isaacs, MT Ross, JM Trent. Physical and Transcript Map of the Hereditary Prostate Cancer Region at Xq27. *Genomics* (2002) Vol. 79 No. 1, 41-50

Anexo VI – Artigo 1

Carvalho R., Pinheiro M.F. Medeiros R., Study of 16 X-STRs in a prostate cancer population sample (preliminary results), Forensic Science International Genetics: Supplement Series 1 (2008), 142-144

Anexo VII – Artigo 2

Localization of Candidate Genes in a Region of High frequency of microvariant alleles for prostate cancer susceptibility: the chromosome region Yp11.2 genetic variation (submitted PLoS Genetics).

Running Title: Prostate cancer and STRs in Yp11.2

Authors: Raquel Carvalho¹, M. Fátima Pinheiro^{2,3,4}, Rui Medeiros^{3,4,5}

Affiliations: Ciências Forenses – Universidade do Porto, Porto, Portugal¹, Instituto Nacional de Medicina Legal – Delegação do Norte, Porto, Portugal², Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal³, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal⁴, Oncologia Molecular, Instituto Português de Oncologia, Porto, Portugal⁵

Contact Information:

Dr. Rui Medeiros, PhD

Oncologia Molecular-CI

Instituto Português de Oncologia

Edifício Laboratórios – Piso4

Rua Dr. António Bernardino Almeida

4200 – 072 Porto, Portugal

Telephone: 00351 225084000 – extension: 5414

Fax: 00351 225084001

e-mail: ruimedei@ipoporto.min-saude.pt

Abstract:

A Y chromosomal role in prostate cancer (PCa) has been suggested since the loss of this chromosome is the most common aberrations in PCa. Study of short tandem repeats (STR) demonstrated that could provide a mean to rapidly scan genomes at known or unknown predisposing loci for some diseases. In this study, AmpFℓSTR[®] Y-Filer[™] kit was used to study region Yp11.2. The results demonstrated that microvariant alleles of DYS458 are overrepresented (p=0,026). We found that allele 12 of DYS393 and allele

19 of DYS458 could have a protective effect ($p=0,0051$; $OR=0,48$; $95\%CI\ 0,27-0,38$ and $p=0,0272$; $OR=0,47$; $95\%CI\ 0,22-0,98$) while patients carrying allele 13 of DYS393 present an increased risk to PCa ($p=0,015$; $OR=1,97$; $95\%CI\ 1,26-3,07$). These results are in concordance with the involvement of Y chromosome in PCa development. STRs alleles studies may add further information from the definition of a genetic profile of PCa resistance or susceptibility. Since the only functional gene at this same region is *TSPY*, this one could play an essential role in the prostate cancer development.

Keywords: prostate cancer, cancer, Y chromosome, microvariant, STR

Author Summary:

Prostate cancer is the most common male-specific cancers. Its incidence is continuously rising and varies considerably between populations, with the chance of developing this type of cancer being highest in Western countries and lowest in Asian countries. Various studies have already suggested that environmental factors, including ultra-violet radiation, smoking, and diet, including meat and fat intake, are involved in the development of this pathology. Until now various genes have already been described as candidate genes for the development of this pathology. In our study, using a method that scans a specific region of the Y chromosome (one of the 23 human chromosomes) a new candidate gene has been identified. The identified gene is implicated in one of the various cell checkpoints that are essential for the cell cycle. Further studies of this region and of this gene are necessary to elucidate the molecular mechanisms that are implicated in this pathology.

Introduction:

Prostate cancer is the most frequent cancer among men in most developed countries, yet little is known about its causes [1]. In European Countries the prostate cancer incidence rates are very high in the northern and western Europe and lower in southern Europe [2-3].

Older age, African ancestry and a positive family history of prostate cancer have long been recognized as important risk factors [1]. Besides those, also environmental, diet (particularly fat and meat) and geographical factors have been demonstrated to be important in prostate cancer [4-8].

The search for genes associated with hereditary prostate cancer has been more difficult than in other cancers, namely colorectal cancer [9]. Until now, only high risk alleles were identified from some candidate genetic loci [10], and from these, only three candidate susceptibility genes have already been identified [10-11].

Although the prognostic relevance of genetic alterations on chromosome Y is not known, the loss of Y chromosome material is reported as one of the most common aberrations in prostate cancer, like loss of Y-chromosome-specific genes [12-13].

Short tandem repeats (STR) are DNA regions with repeat units of 2-6bp in length. The number of those repeats is variable among individuals, which make them effective for human identification purposes. The STR used in the forensic field can also be used for screening genomes looking for loci somehow related to some diseases. Such use must be recognised at the outset of the use of such systems [14].

Genetic material of Y chromosome is loss in prostate cancer samples (demonstrating that this chromosome could have some role in the development of disease) [12; 15-18]. Furthermore, results using STR markers have been previously reported to influence cancer susceptibility in prostate cancer patients [19]. We studied STR forensic markers at region Yp11.2 in an attempting to search for some prostate cancer risk candidate loci in Y chromosome.

Results and Discussion:

Our study was focused in STR forensic markers at region Yp11.2 in an attempting to search for some prostate cancer risk candidate loci in this chromosome (Figure 1).

Figure 1

We found that in the group of patients, microvariant alleles (rare alleles that are encountered in the human population that differ from common allele by one or more base pairs) [21] for DYS458 are over represented (9 out 282 in the prostate cancer group in comparison to none out 175 in the control group; $p=0,026$) suggesting that men carrying DYS458 microvariant alleles are at increased risk to prostate cancer. In table 1 and figure 2 are reported the microvariant alleles for DYS458 presenting insertions or deletions among the samples studied.

Table 1

Figure 2

In table 2 we show results regarding the allelic frequencies of DYS393 and DYS458 in prostate cancer patients in comparison with control group. No statistical differences were found for DYS456 and DYS19. We found a protective effect for allele12 of DYS392 and male individuals carrying this allele present a lower risk of prostate cancer ($p=0,0051$; OR 0,48; 95% CI 0,27-0,83). Moreover, this protective effect was also found in man carrying allele 19 of DYS458 ($p=0,0272$; OR 0,47; 95% CI 0,22–0,98). On the other hand, males with allele 13 of DYS393 showed a significantly higher risk to develop prostate cancer ($p=0,0015$; OR 1,97; 95% CI 1,26–3,07). We further analysed the combined protective effect in simultaneously carrying individuals of allele 12 (DYS393) and allele 19 (DYS458) and found that they are overrepresented in the normal control group (11 out 175 versus none of 282 in prostate cancer; $p<0,001$). The effect of simultaneously being a carrier of allele 13 (DYS393) and other allele than 19 (DYS458) was also analysed. In this case, male who have this specific combination of alleles (13/non 19) present a higher risk to develop prostate cancer ($p=0,0043$; OR 1,79; 95% CI 1,17–2,74).

Table 2

The incomplete repeats found in the microvariant alleles could be the result of DNA polymerase slippage during DNA replication as observed by Suzuki, 2001 in mammalian cells when studying the instability of STRs [22]. We hypothesy that DYS458 genetic variants may be in linkage disequilibrium with tumour related genes such as oncogenes or tumour suppressor genes. DYS458 is located in the short arm of Y chromosome, more precisely in region Yp11.2, just like *TSPY* gene (testis specific protein). *TSPY* gene is a repeat gene mapped to the critical region harbouring the gonadoblastoma locus on the Y chromosome (GBY), the only oncogenic locus on this male-specific chromosome [22] and it is the only functional gene located on Yp11.2 [23]. Various studies focused on analysing *TSPY* expression in cell lines demonstrated that in prostate cancer *TSPY* is deleted [23] or have aberrant expression [23; 25-26]. *TSPY* expression increases cell proliferation in vitro and tumorigenesis in vivo. *TSPY* is capable of mediating the transition of its host cells through G₂/M phase at a faster pace than those lacking *TSPY* [23]. The checkpoint at G₂ affords some protection against

DNA damage since there are two copies of the genome instead of the single copy presented in G_1 [27]. In cells with aberrant expression of *TSPY* like those of prostate cancer, some errors of DNA replication cannot be repaired since the transition of G_2/M phase is faster than normal. This rapid transition could be responsible for the microvariant alleles found in the prostate cancer samples, since G_2/M checkpoints include the checks for damaged DNA, unreplicated DNA, and checks that ensure that the genome is replicated once and only once per cell cycle.

Also, Riley, 2005 have demonstrated that many STRs are transcribed as 5' and 3' untranslated sequences (UTRs) and that they exhibit evidence of selection pressure, including STR-coupling preferences, STR conservation, interspecies STR-STR replacements, and STR variants implicated in certain diseases [28]. They studied the STR replacements in UTRs among species near disease related genes, namely in prostate cancer and concluded that some STRs replacements expand the list of STR sequences that may contribute to genetic activity and to disease process [28]. In a similar way, other STRs, like those analysed in these study, could also affect the gene activity.

To the best of our knowledge our study is the first to analyse DYS393, DYS456, DYS458 and DYS19 loci in prostate cancer among Caucasian populations. Ewis et al, 2002 studied the allele distribution of only DYS19 in a population sample of Japanese prostate cancer. In that study the comparison between DYS19 allele frequency distribution among Japanese patients with prostate cancer and that of normal controls revealed significant differences regarding susceptibility or resistance to prostate cancer. The authors concluded that males from different Y chromosomal origins are different regarding their susceptibility or resistance for developing prostate cancer [30]. In the present study the differences between allele distribution for DYS19 weren't observed but it's a fact that the contribution of genetic polymorphisms to the risk of prostate cancer may be dependent on the population in study, as well on several environmental and diet factors that influence that population [29].

In conclusion, individuals that carrying Y chromosome STR alleles commonly used in the forensic area may present different risk for the development of prostate cancer. The results of this study are in concordance with the involvement of Y chromosome in prostate cancer development and STRs alleles studies may add further information from the definition of a genetic profile of prostate cancer resistance or susceptibility.

Materials and Methods:

We conducted a case-control study analysing 282 patients diagnosed with prostate cancer at the Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal [30-31]. A population control group of 175 male individuals was used for this control-case study [32]. All samples were obtained with the informed consent of the participants before their inclusion in the study.

Blood samples were obtained with a standard venipuncture technique using EDTA-containing tubes. DNA was extracted from the white blood cell fraction, from each study object, by a salting out procedure [33].

The PCR was performed according to manufacturers (AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ Y-Filer $^{\text{TM}}$ PCR amplification kit (Applied Biosystems)) and the typing was achieved using ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) with a 36 cm array and POP-4 polymer. Fragment sizes were determined automatically using Genescan Analysis Software v3.7 (Applied Biosystems) and allele designation was made by comparison with allelic ladder included in the kit with Genotyper 3.7 Softwares (Applied Biosystems).

Alleles of different size compared to the allelic ladders and a reference sample (007 from Applied Biosystems) were sequenced to confirm the number of repeats and possible presence of sequence anomalies for loci DYS458. A new set of primers were designed using PRIMER3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) and used for sequencing (forward primer 5'GGGTGGTGGAGGTTACTGTG3' and reverse primer 5'AGGTTTCATGCCATTCTCCTG3'). PCR amplification was carried out using the QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen) at 1x Qiagen multiplex PCR master mix, 0,5x Qiagen Q solution and 1 μ L of genomic DNA (non quantified) in a 25 μ L final reaction volume. Primer concentration in the reaction was 1 μ M.

PCR amplified products were purified with MinElute (Qiagen) and the sequencing reaction was performed with Big $^{\circledR}$ Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Products were visualized in an ABI PRISM 3100 Genetic Analysis electrophoresis system and analysed with sequencing analysis 3.7 software (Applied Biosystems).

Analysis of data was performed using the computer software SPSS for Windows (version 13.0, SPSS Inc, 2004). Chi-square analysis was used to compare categorical variables. A 5% level of significance was used in the analysis. The odds ratio (OR) and

its 95% confidence interval (CI) were calculated as a measure of the association between alleles and prostate cancer risk.

Acknowledgements:

The authors gratefully acknowledge FCT-Fundação para a Ciencia e Tecnologia (PTDC/SAU-FCF/71552/2006), Novartis Oncology Portugal and Liga Portuguesa Contra o Cancro-Centro Regional do Norte for their support.

References:

1. D.J. Schaid, The complex genetic epidemiology of prostate cancer, *Human Molecular Genetics*, Vol. 13, Review Issue 1, (2004) R103–R121;
2. M. Parkin, The global burden of cancer, *Sem Cancer Biol*, 8 (1998) 60-67
3. F. Levi, L. La Vecchia, P. Boyle, The rise and fall of prostate cancer, *Eur J Cancer Prev*, 9 (2000) 381-385
4. P. Ekman, Genetic and environmental factors in prostate cancer genesis: identifying high-risk cohorts, *Eur Urol*, 35 (5-6) (1993) 362-369
5. E. Giovannucci, E.B. Rimm, G.A. Coditz, M.J. Stampfer, A. Ascherio, C.C. Chute, W.C. Willett, A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 85 (19) (1993) 1571-1579
6. M.J. Chan, M.J. Stampfer, E.L. Giovannucci, What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology, *Sem Cancer Biol*, 8 (1998) 263-273
7. Y. Fradet, F. Meyer, I. Bairati, R. Shadmani, L. Moore, Dietary fat and prostate cancer progression and survival, *Eur Urol*, 35 (5-6) (1999) 388-391
8. A.W. Hsing, S.S. Devesa, Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest?, *Epidemiol Rev*, 23 (2001) 3-13
9. W.A. Schulz, M. Burchardt, M.V. Cronauer, Molecular biology of prostate cancer, *Molecular Human Reproduction*, 9 (8) (2003) 437-448
10. M.A. Rubin, A.M. De Marzo, Molecular genetics of human prostate cancer, *Modern Pathology*, 17 (2004) 380-388
11. K.P. Porkka, T. Visakorpi, Molecular mechanisms of prostate cancer, *European Urology*, 45 (2004) 683-691

12. G. Perinchery, M. Sasaki, A. Angan, V. Kumar, P. Carroll, R. Dahiya, Deletion of Y-chromosome specific genes in human prostate cancer, *The Journal of Urology* 163 (2000) 1339-1342
13. J.J. Jordan, A.L. Hanlon, T.I. Al-Saleem, R.E. Greenberg, J.V. Tricoli, Loss of the short arm of Y chromosome in human prostate carcinoma, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 124 (2001) 122-126
14. C. Kimpton, P. Gill, E. D'Aloja, J.F. Andersen, W. Bar, S. Holgersson, S. Jacobsen, V. Johnson, A.D. Kloosterman, M.V. Lareu, L. Nellemann, K. Pfitzinger, C.P. Phillips, S. Rand, H. Schmitter, H. Schneider, M. Sternerssen, M.C. Vide, Report on the second EDNAP collaborative STR exercise, *Forensic Science International*, 71 (1995) 137
15. J.J. Konig, W. Teubel, J.C. Romijn, F.H. Schroeder, A. Hagemeijer, Gain and Loss of Chromosomes 1, 7, 8, 10, 18 and Y in 46 Prostate Cancers, *Human Pathology* 27 (7) (1996) 720-727
16. A. Erbersdobler, P. Bardenhagen, R.P. Henke. Numerical Chromosomal anomalies in latent adenocarcinomas of the prostate, *The Prostate* 38 (1999) 92-99
17. J.C. Alers, J. Rochat, P.J. Krijtenburg, W.C.J. Hop, R. Kranse, C. Rosenberg, H.J. Tanke, F.H. Schoeder, H. Dekken, Identification of genetic markers for prostatic cancer progression, *Laboratory Investigation*, 80 (6) (2000) 931-942
18. S. Paracchini, C.L. Pearce, L.N. Kolonel, D. Altshuler, B.E. Henderson, C. Tyler-Smith, A Y chromosomal influence on prostate cancer risk: the multi-ethnic cohort study, *Journal of Medical Genetics*, 40 (2003) 815-819
19. A.A. Ewis, J. Lee, T. Naroda, K. Sasahara, T. Sano, S. Kagawa, T. Iwamoto, Y. Nakahori, Linkage between prostate cancer incidence of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19, *J. Med. Invest.*, 49 (1-2) (2002) 56-60
20. E.K. Hanson, J. Ballantyne, Comprehensive annotated STR physical map of the human Y chromosome: forensic implications, *Legal Medicine* 8 (2006) 110-120
21. J.M. Butler, Biology of STRs: Stutter products, non-template addition, microvariants, null alleles and mutation rates. In: *Forensic DNA typing*. Elsevier Academic Press, 2005, pp. 129-130
22. A. Suzuki, A. Maruno, T. Tahira, K. Hayashi, Polar alteration of short tandem repeats (STRs) in mammalian cells, *Mutation Research*, 474 (2001) 159-168

23. S.W. Oram, X.X. Liu, T.L. Lee, W.Y. Chan, Y.F.C. Lau, TSPY potentiates cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell cycle progression in HeLa and NIH3T3 cells, *BMC Cancer*, 6 (2006) 154
24. S. Vijayakumar, D.C. Hall, X.T. Reveles, D.A. Troyer, I.M. Thompson, D. Garcia, R.H. Xiang, R.J. Leach, T.L. Johnson-Pais, S.L. Naylor, Detection of Recurrent Copy Number Loss at Yp11.2 Involving *TSPY* Gene Cluster in Prostate Cancer Using Array-Based Comparative Genomic Hybridization, *Cancer Research*, 66 (2006) 4055-4064
25. Y.C. Lau, J. Zhang, Expression analysis of thirty one Y chromosome genes in human prostate cancer, *Molecular Carcinogenesis*, 27 (2000) 308-321
26. V.K. Dasari, R.Z. Goharderakhshan, G. Perinchery, L.C. Li, Y. Tanaka, J. Alonzo, R. Dahika, Expression analysis of Y chromosome genes in human prostate cancer, *The Journal of Urology*, Vol.165 (2001) 1355-1341
27. B. Lewin, *GENES VII* (New York: Oxford University Press), (2000), pp. 835-840
28. D.E. Riley, J.N. Krieger, Short tandem repeat (STR) replacements in UTRs and introns suggest an important role for certain STRs in gene expression and disease, *Gene* 344 (2005) 203-211
29. R. Medeiros, A. Vasconcelos, S. Costa, D. Pinto, P. Ferreira, F. Lobo, A. Morais, J. Oliveira, C. Lopes, Metabolic Susceptibility Genes and Prostate Cancer Risk in a Southern European Population: The Role of Glutathione S-Transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 Genetic Polymorphisms, *The Prostate*, 58 (2004) 414-420
30. R. Medeiros, A. Morais, A. Vasconcelos, S. Costa, D. Pinto, J. Oliveira, C. Lopes, The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the susceptibility to prostate cancer of a southern European population, *J Hum Genet*, 47(8) (2002) 413-418
31. R. Medeiros, A. Vasconcelos, S. Costa, D. Pinto, A. Morais, J. Oliveira, C. Lopes, Steroid hormone genotypes ARStuI and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer, *Cancer Genet Cytogenet*, 141 (2003) 91-96
32. M.L. Pontes, L. Cainé, D. Abrantes, G. Lima, M.F. Pinheiro, Allele frequencies and population data for 17 Y-STR loci (AmpF ℓ STR[®] Y-Filer[™]) in a Northern Portuguese population sample, *Forensic Sci Int.*, 170 (2007) 62-7
33. R. Mullenbach, P.J. Lagoda, C. Welter, An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues, *Trends Genet* 5 (1989) 391

Figure Legends:

Figure 1 – Chromosomal location of STR analysed in this study. TSPY (testis specific protein) location is also shown because it is the nearest gene to microvariants at DYS458 [20].

Figure 2 – Examples of microvariant alleles. The repetitive motif is GAAA. (A) reference sample (007 – Applied Biosystems); (B) sample with deletion of two nucleotides (AA). The repetitive motif is incomplete; (C) sample with insertion of two nucleotides (AA). The repetitive motif has two more nucleotides.

Table 1 – Characterization of microvariant alleles (rare alleles that are encountered in the human population that differ from common allele by one or more base pairs) of DYS458 in prostate cancer group.

Sample	Allele	Observations
3781	16.2	Insertion of two nucleotides (AA) between repetition 14 and 15
3730	17.2	Deletion of two nucleotides (AA) between repetition 11 and 12
3703	17.2	Insertion of two nucleotides (AA) between repetition 15 and 16
3568	17.2	Insertion of two nucleotides (AA) between repetition 15 and 16
3858	17.2	Insertion of two nucleotides (AA) between repetition 15 and 16
3734	18.2	Insertion of two nucleotides (AA) between repetition 16 and 17
3927	19.2	Insertion of two nucleotides (AA) between repetition 17 and 18
3817	19.2	Insertion of two nucleotides (AA) between repetition 17 and 18

Table 2 – Allelic frequencies of DYS393 and DYS458 in control group and in prostate cancer.

Locus	Allele	Controls (n)	Cases (n)	p*	O.R.	95% IC
DYS393	12	36/175	31/282	0,0051	0,48	0,27-0,83
	13	114/175	221/282	0,0015	1,97	1,26–3,07
DYS458	19	20/175	16/282	0,0272	0,47	0,22–0,98
DYS393 + DYS458	12 ; 19	11/175	0/282	<0,001	-	-
	13 ; other than 19	106/175	207/282	0,0043	1,79	1,17–2,74

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

*Chi-square test