

PSA positivo, espermatozoides ausentes: vale a tentativa de obtenção de perfil genético masculino?

M. Toselli^a, A.C. Pacheco^b, C.R. Dias Filho^c

^a Centro Universitário São Camilo, São Paulo (SP), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: milenatoselli@hotmail.com Tel.: +55-11-971642901.

^b Instituto de Criminalística, Superintendência da Polícia Técnico-Científica, São Paulo (SP), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: ana.acp@policiacientifica.sp.gov.br Tel.: +55-11-3815-8200.

^c Instituto de Criminalística, Superintendência da Polícia Técnico-Científica, São Paulo (SP), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: diascr@gmail.com

Recebido em 04/03/2019; Revisado em 27/05/2019; Aceito em 14/08/2019

Resumo

A violência sexual é uma questão histórica e cultural que afeta crianças, adolescentes e adultos. A ausência de prova pericial e a falta de prestação de queixa da vítima dificulta a condenação do agressor. Porém, muitas vezes é possível a obtenção do perfil genético do agressor pela adequada coleta de vestígios no exame de corpo de delito da vítima e desta forma a vinculação de um suspeito ao crime. Em material relacionado à violência sexual, a perícia efetua exames preliminares para a constatação de material biológico, como a pesquisa de antígeno prostático específico (PSA) e a detecção da presença de espermatozoides através de microscopia de luz. É relativamente comum a abstenção dos procedimentos genéticos quando da ausência ou exiguidade de espermatozoides na amostra, sendo esses casos muitas vezes arquivados. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de se obter um perfil genético masculino isolado de peças que resultaram PSA positivo e a pesquisa de espermatozoide negativo ou raro. Foram analisados 61 casos durante o período de janeiro a dezembro de 2014, dos quais, 28 casos resultaram negativos na pesquisa de espermatozoides. Desses foi possível isolar o perfil masculino em 13 casos. Dos 33 casos com espermatozoides raros, 66,67% (22 casos) resultaram em sucesso na obtenção de perfil masculino isolado. Os resultados são indicativos de que esses casos não devem ser arquivados após a constatação de líquido seminal, sem que se faça uma tentativa para obtenção de um perfil genético masculino. Foi possível isolar o perfil genético masculino em 57,37% dos casos estudados através das células espermática e/ou epitelial do criminoso, sendo esses perfis masculinos importantes não apenas para o confronto com o perfil de suspeitos, mas também para a alimentação do banco nacional de dados para futura identificação do agressor.

Palavras-Chave: Azoospermia, Base de dados genéticos, Delitos sexuais, Perfilação da região polimórfica, PSA

Abstract

Sexual violence is a historical and cultural issue that affects children, adolescents and adults. The lack of expert evidence and the victim's underreport make it difficult to condemn the aggressor. However, it is often possible to obtain the genetic profile of the offender through proper evidence collection during the physical examination of the victim and thus assisting to connect the suspect to the crime. In sexual assault evidence, the police laboratory conducts preliminary examinations searching for biological material, such as prostate specific antigen (PSA) screening and the detection of spermatozoa through light microscopy. It is relatively common to abstain from genetic procedures when there is absence or rarity of spermatozoa in the sample and these cases are often dismissed. Thus, the present study aimed to verify the possibility of obtaining a male genetic profile isolated from objects that resulted positive for PSA screening and negative or rare for spermatozoa microscopy. 61 cases were analyzed from January to December 2014, of which 28 cases tested negative for sperm cells. From these it was possible to isolate the male profile in 13 cases. Among the 33 cases containing rare spermatozoa, 66.67% (22 cases) were successful in obtaining an isolated male profile. The results are indicative that these cases should not be filed right after the screening for seminal fluid, without attempting to obtain a male genetic profile. It was possible to isolate the male genetic profile in 57.37% of the cases studied through the sperm and / or epithelial cells of the criminal, and these male profiles are important not only for the confrontation with the profile of suspects, but also for feeding the national profile database for future identification of the offender.

Keywords: Azoospermia, Genetic Database, Sexual offenses, STR profiling, PSA.

1. INTRODUÇÃO

O abuso sexual consiste no prazer ou gratificação do abusador através de carícias, manipulação de mama, ânus ou genitálias de uma criança, adolescente ou adulto sem o seu consentimento, podendo chegar até ao ato sexual em si, com ou sem penetração através do uso ou não de violência física [1]. A violência sexual atinge tanto mulheres quanto homens, não importando, portanto, o sexo, a faixa etária, a etnia ou a classe social. Apesar disso, mulheres jovens e adolescentes apresentam um maior risco [2]. O problema é que, quando crianças e adolescentes, a maioria das vítimas de violência sexual deixam de buscar ajuda médica e policial e, o motivo mais frequente se relaciona ao fato de tais casos ocorrerem no ambiente intrafamiliar e em repetidas vezes, fazendo com que a vítima sinta medo e/ou vergonha [3].

Segundo o 9º Anuário Brasileiro de Segurança Pública, foram registrados 47.646 casos de estupro no Brasil no ano de 2014. No estado de São Paulo foram registrados 10.026, referente a 22,8% dos casos no Brasil. Tais dados estatísticos somente reforçam a realidade da violência contra a mulher, em sua maioria e que os crimes sexuais no Brasil são um grave problema de Segurança Pública [4].

Em São Paulo, existem delegacias destinadas às vítimas femininas de qualquer tipo de agressão sejam elas: física, psicológica ou até sexual. Elas são denominadas DDM (“Delegacia de Defesa da Mulher”, apesar de o nome oficial ser “Delegacias de Polícia de Defesa da Mulher”), instituídas pela Lei Estadual no. 5.467 de 24 de dezembro de 1986. Nessas delegacias as vítimas são atendidas por policiais mulheres, em casos de qualquer abuso sexual. Após o registro da ocorrência, são submetidas a exames de corpo de delito, realizados no Instituto Médico Legal (IML), onde são coletados diversos tipos de materiais supostamente contendo traços deixados pelo agressor sexual, como *swabs* vaginais, anais e orais, junto com qualquer outro vestígio, como vestimentas e/ou objetos envolvidos ao ato sexual, como por exemplo, preservativos [5]. Os principais vestígios nesses casos envolvem a suposta presença de sêmen deixado no corpo da vítima e/ou nas vestimentas utilizada na ocasião do crime [6].

Tais vestígios, uma vez coletados, são encaminhados ao Instituto de Criminalística (IC), onde passam por exames periciais visando à constatação de material de origem seminal na amostra, seguindo, quando o caso, de perfilamento genético masculino. Um dos primeiros exames realizados envolve a verificação da presença de antígeno prostático específico (PSA). O PSA é uma glicoproteína que está presente em alta concentração no líquido seminal. Na área clínica, é utilizado como marcador na identificação de doenças relacionadas à

próstata, mas no âmbito da perícia criminal é um marcador na determinação dos vestígios de esperma coletados das vítimas, preservativos e a partir de manchas obtidas em peças de vestuário [7].

De acordo com Bueno e Massuda [7], em 2014, resultados positivos, tanto para a presença de PSA como de espermatozoides, determinam uma alta chance da obtenção do perfil genético do agressor por meio da análise de DNA. Porém, em algumas situações, pode ocorrer resultados positivos na pesquisa de PSA e, na mesma amostra, resultados negativos na pesquisa de espermatozoides, por meio de microscopia de luz. Tal situação pode ocorrer por várias causas, como ausência de ejaculação propriamente dita ou em casos de agressor vasectomizado, azoospermico ou oligospermico. Entretanto, a ausência de espermatozoides não impossibilita a obtenção do perfil genético do agressor, já que o líquido seminal contém o PSA, e diferentes células epiteliais de descamação do trato geniturinário masculino [8]. Não é incomum a abstenção dos procedimentos genéticos quando da ausência ou exiguidade de espermatozoides na amostra, sendo muitas vezes arquivados. Tal situação é motivo de preocupação, considerando que há relatos de sucesso na obtenção do perfil genético masculino, ainda que o resultado da pesquisa por espermatozoides não seja promissor.

Os denominados “casos abertos”, ainda com investigação em curso, podem se beneficiar da obtenção de perfil genético do estupro, devido à possibilidade de tais perfis serem inseridos e pesquisados em bancos de dados criminais de DNA [9].

2. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo verificar a possibilidade de se obter um perfil genético masculino isolado de amostras, com resultados preliminares positivos para o antígeno prostático específico na ausência ou exiguidade de espermatozoides, por microscopia ótica, coletadas de exames provenientes de crimes sexuais.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Obtenção das amostras

As amostras analisadas para a constatação de líquido seminal e presença de espermatozoides são referentes aos casos de crimes sexuais recebidos no Núcleo de Biologia e Bioquímica (NBB) do Instituto de Criminalística (IC) do Estado de São Paulo. As amostras analisadas são referentes ao período de janeiro a dezembro de 2014.

Quanto aos tipos de peças foram analisadas: 23 calcinhas, 11 preservativos, 9 cuecas, 9 fragmentos de tecidos, 4 calças, 2 blusas, 2 shorts e 1 absorvente.

Os peritos responsáveis por estas amostras constataram a presença do antígeno prostático específico, através de kit comercial (*PSA ONE STEP TEST* - INLAB cód. 9963) e a pesquisa dos espermatozoides através de coloração com eritrosina e microscopia de luz. Nos casos que resultaram PSA positivo e a presença de espermatozoides negativos ou raros, um fragmento das peças de exame foi armazenado e encaminhado ao Laboratório de DNA do NBB. Foram analisadas 61 amostras que possuíram resultado de PSA positivo dos quais foram separados pela pesquisa de espermatozoide em negativo ou raro. Essas amostras foram submetidas à extração, quantificação, amplificação e eletroforese de DNA para a obtenção dos perfis de microssatélites da amostra.

3.2. Extração do DNA

A extração do DNA obedeceu aos diversos protocolos previamente estabelecidos pelos fabricantes e de uso rotineiro no Laboratório de DNA do NBB. Essas amostras são submetidas a dois tipos de extrações: uma diferencial, que consiste na separação em fração espermatozoide (FE) e fração não espermatozoide (FNE) e outra direta. Após a separação das duas frações e também da parte direta, estas são submetidas à extração de DNA por resina magnética.

Para a realização das extrações de DNA por resina magnética, utilizou-se os kits comerciais: *DNA IQ System™* (Promega Corporation – Cat. # DC6700), *PrepFiler® Automated Forensic DNA Extration Kit* (Applied Biosystems – Part nº 4463353) e o *EZ1® DNA Investigator Kit* (Cat. no. 952034) para a realização manual ou automatizada com o uso de plataforma robótica *TECAN Freedom EVO 150*.

3.3. Quantificação do DNA

Após a extração de todas as amostras, foi realizada a quantificação do DNA por reação em cadeia polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, no equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), utilizando o kit comercial *Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit* (Cat. no. 4482910). Este sistema possibilitou quantificar o DNA humano e masculino provenientes do processo de retirada do DNA, sendo capaz de estabelecer a relação entre a quantidade de DNA feminino e DNA masculino em casos de mistura.

3.4. Reação de Amplificação

De posse das concentrações de DNA humano e DNA masculino presentes em cada amostra, estas foram submetidas à amplificação, por PCR, de microssatélites autossômicos do tipo STR (*short tandem repeats*), com o uso dos seguintes sistemas: *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit da Applied Biosystems* (Part. No. 4476135), *PowerPlex® Fusion System da Promega Corporation* (Cat. No. DC2408) e o *PowerPlex® Fusion6C System da Promega Corporation* (Cat. No. DC2705).

Na sequência das amplificações as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em equipamento *ABI 3500xL Genetic Analyzer* que detecta em tempo real a fluorescência emitida pelos fluoróforos utilizados para a marcação dos *primers*. Através do *software Genemapper ID-X* os dados são analisados e comparados com escadas alélicas resultando num perfil alélico na forma de um eletroferograma.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados Gerais

Durante o período estudado com esses resultados preliminares, dos 61 casos analisados (tab. 1), 28 (45,9%) apresentaram ausência de espermatozoides e em 33 casos (54,1%) foram constatados raros espermatozoides (menos do que 10 células espermatozoides na lâmina de microscopia).

4.2. Resultados dos casos com espermatozoides negativos

Ao analisar os 28 casos nos quais os resultados preliminares para a pesquisa de espermatozoides foram ausentes (tab. 2), pode-se verificar que em 13 casos (46,4%) foram obtidos perfis alélicos masculinos isolados. Em 4 casos (14,3%) o perfil alélico obtido foi na forma de uma mistura de DNA da vítima com o DNA do agressor, mesmo após algumas repetições na tentativa de se isolar o perfil alélico masculino.

Em 10 casos (37,5%) dos 28 analisados não foi possível obtenção de perfil ou o mesmo apresentava mistura, ou o único perfil alélico obtido foi apenas o feminino. E em um caso (3,6%) não foi obtido nenhum perfil alélico.

Em relação aos perfis alélicos masculino isolados, 9 destes foram inseridos no CODIS (*Combined DNA Index System*).

Tabela 1- Tabela geral com os 61 casos analisados de janeiro a dezembro de 2014.

Nº	OBJETO/PEÇA	PSA	PESQUISA DE ESPERMATOZÓIDE	[DNA HUMANO] (ng/µL)	[DNA MASCULINO] (ng/µL)	PERFIL MASCULINO ISOLADO	PERFIL MISTURA	INSERIDO NO CODIS
1	CALCINHA	+	NEGATIVO	1,3936	0,9432	SIM	NÃO	SIM
2	PRESERVATIVO	+	RAROS	0,0019	0,0017	NÃO	SIM	NÃO
3	RETALHO DE BANCO	+	RAROS	0,1787	0,2399	SIM	NÃO	SIM
4	BLUSA	+	RAROS	0,0181	0,0095	NÃO	SIM	NÃO
5	CALCINHA	+	RAROS	0,0342	0,0184	SIM	NÃO	SIM
6	LENÇOL	+	NEGATIVO	0,0080	0,0077	NÃO	SIM	NÃO
7	EDREDON	+	NEGATIVO	1,5003	1,6251	SIM	NÃO	SIM
8	PRESERVATIVO	+	NEGATIVO	0,0331	0,0235	NÃO	SIM	NÃO
9	PRESERVATIVO	+	RAROS	0,1320	0,1196	SIM	NÃO	SIM
10	PRESERVATIVO	+	RAROS	0,0369	0,0489	SIM	NÃO	SIM
11	CALCINHA	+	RAROS	4,4340	0,0060	NÃO	NÃO	NÃO
12	CALCINHA	+	NEGATIVO	0,0043	0,0044	NÃO	NÃO	NÃO
13	PRESERVATIVO	+	NEGATIVO	0,4238	0,0028	NÃO	NÃO	NÃO
14	PRESERVATIVO	+	NEGATIVO	0,7075	0,0110	NÃO	NÃO	NÃO
15	CUECA	+	NEGATIVO	19,9711	20,4522	SIM	NÃO	NÃO
16	CUECA	+	RAROS	0,8740	0,3413	NÃO	SIM	NÃO
17	CALÇA	+	NEGATIVO	0,0003	0,0004	SEM PERFIL	SEM PERFIL	NÃO
18	CALCINHA	+	RAROS	0,0010	0,0016	SIM	NÃO	SIM
19	CALCINHA	+	RAROS	0,7039	0,0203	NÃO	SIM	NÃO
20	BLUSA	+	RAROS	0,1444	0,1218	SIM	NÃO	SIM
21	ABSORVENTE	+	RAROS	0,0277	0,0319	SIM	NÃO	SIM
22	CALÇA	+	RAROS	2,3710	2,1515	SIM	NÃO	SIM
23	CALCINHA	+	RAROS	0,0220	0,0158	SIM	NÃO	SIM
24	CUECA	+	NEGATIVO	0,0043	0,0060	SIM	NÃO	NÃO
25	CALCINHA	+	NEGATIVO	0,0577	Ø	NÃO	NÃO	NÃO
26	CALCINHA	+	RAROS	0,0062	0,0035	NÃO	SIM	NÃO
27	SHORT	+	RAROS	11,2203	12,4722	SIM	NÃO	SIM
28	FRAG BANCO VEICULAR	+	NEGATIVO	0,0863	0,1119	SIM	NÃO	NÃO
29	CUECA	+	NEGATIVO	0,1489	0,1175	SIM	NÃO	SIM
30	CALCINHA	+	NEGATIVO	0,0115	0,0088	SIM	NÃO	SIM
31	PRESERVATIVO	+	NEGATIVO	0,0237	0,0259	SIM	NÃO	SIM
32	CUECA	+	NEGATIVO	0,0980	0,0670	NÃO	SIM	NÃO
33	CALCINHA	+	RAROS	0,0017	0,0029	NÃO	SIM	NÃO
34	CALCINHA	+	NEGATIVO	0,3011	0,1540	SIM	NÃO	SIM
35	TOALHA	+	NEGATIVO	0,0045	0,0034	SIM	NÃO	SIM
36	CALCINHA	+	NEGATIVO	13,7865	0,1976	NÃO	NÃO	NÃO
37	CALCINHA	+	RAROS	0,0137	0,0141	SIM	NÃO	SIM
38	SHORT	+	RAROS	2,6952	2,8963	SIM	NÃO	SIM
39	PRESERVATIVO	+	RAROS	0,0700	0,0800	SIM	NÃO	SIM
40	CALCINHA	+	RAROS	0,1660	0,1640	SIM	NÃO	SIM
41	CALÇA	+	NEGATIVO	0,0088	0,0058	SIM	NÃO	SIM
42	TECIDO	+	RAROS	0,0078	0,0054	NÃO	SIM	NÃO
43	TECIDO	+	RAROS	0,3237	0,4302	SIM	NÃO	SIM
44	PRESERVATIVO	+	RAROS	0,0468	0,0079	SIM	NÃO	SIM
45	CUECA	+	RAROS	0,7819	0,7237	SIM	NÃO	SIM
46	CUECA	+	NEGATIVO	0,6892	0,6348	SIM	NÃO	NÃO
47	FRONHA	+	NEGATIVO	0,0064	0,0061	NÃO	NÃO	NÃO
48	LENÇOL	+	NEGATIVO	0,2777	0,0083	NÃO	NÃO	NÃO
49	CALCINHA	+	NEGATIVO	0,6673	0,0882	SIM	NÃO	SIM
50	CUECA	+	RAROS	0,0024	0,0032	NÃO	SIM	NÃO
51	CALCINHA	+	RAROS	16,0954	0,1300	NÃO	SIM	NÃO
52	PRESERVATIVO	+	RAROS	0,1113	0,0769	SIM	NÃO	SIM
53	PRESERVATIVO	+	RAROS	0,0085	0,0053	SIM	NÃO	SIM
54	CALCINHA	+	NEGATIVO	15,6071	0,2525	NÃO	NÃO	NÃO
55	CALÇA	+	RAROS	5,6234	7,2984	SIM	NÃO	SIM
56	CALCINHA	+	NEGATIVO	0,0057	0,0049	NÃO	SIM	NÃO
57	CUECA	+	RAROS	0,0192	0,0157	SIM	NÃO	SIM
58	CALCINHA	+	RAROS	1,5685	1,3683	SIM	NÃO	SIM
59	CALCINHA	+	NEGATIVO	0,1971	0,0004	NÃO	NÃO	NÃO
60	CALCINHA	+	RAROS	0,1024	0,0506	NÃO	SIM	NÃO
61	CALCINHA	+	NEGATIVO	0,0007	0,0012	NÃO	NÃO	NÃO

Legenda: PSA Antígeno prostático específico; CODIS *Combined DNA Index System*, software utilizado pelo banco de dados.

Tabela 2- Casos que resultaram PSA positivo e espermatozoides negativos.

NÚMERO	OBJETO/PEÇA	CONCENTRAÇÃO DE DNA HUMANO (ng/μL)	CONCENTRAÇÃO DE DNA MASCULINO (ng/μL)	PERFIL MASCULINO ISOLADO	PERFIL MASCULINO EM MISTURA	PERFIL INSERIDO NO CODIS
1	CALCINHA	1.3936	0.9432	SIM	NÃO	SIM
6	LENÇOL	0.0080	0.0077	NÃO	SIM	NÃO
7	EDREDON	1.5003	1.6251	SIM	NÃO	SIM
8	PRESERVATIVO	0.0331	0.0235	NÃO	SIM	NÃO
12	CALCINHA	0.0943	0.0444	NÃO	NÃO	NÃO
13	PRESERVATIVO	0.4238	0.0028	NÃO	NÃO	NÃO
14	PRESERVATIVO	0.7075	0.0110	NÃO	NÃO	NÃO
15	CUECA	19.9711	20.4522	SIM	NÃO	NÃO
17	CALÇA	0.0003	0.0004	NÃO FOI OBTIDO PERFIL	NÃO FOI OBTIDO PERFIL	NÃO
24	CUECA	0.0043	0.0060	SIM	NÃO	NÃO
25	CALCINHA	0.0577	0	NÃO	NÃO	NÃO
28	FRAG/BANCO VEICULAR	0.0863	0.1119	SIM	NÃO	NÃO
29	CUECA	0.1489	0.1175	SIM	NÃO	SIM
30	CALCINHA	0.0115	0.0088	SIM	NÃO	SIM
31	PRESERVATIVO	0.0237	0.0259	SIM	NÃO	SIM
32	CUECA	0.0980	0.0670	NÃO	SIM	NÃO
34	CALCINHA	0.3011	0.1540	SIM	NÃO	SIM
35	TALHA	0.0045	0.0034	SIM	NÃO	SIM
36	CALCINHA	13.7865	0.3796	NÃO	NÃO	NÃO
41	CALÇA	0.0088	0.0058	SIM	NÃO	SIM
46	CUECA	0.6892	0.6348	SIM	NÃO	NÃO
47	FRONHA	0.0064	0.0061	NÃO	NÃO	NÃO
48	LENÇOL	0.2777	0.0083	NÃO	NÃO	NÃO
49	CALCINHA	0.6673	0.0882	SIM	NÃO	SIM
54	CALCINHA	15.6071	0.2525	NÃO	NÃO	NÃO
56	CALCINHA	0.0057	0.0049	NÃO	SIM	NÃO
59	CALCINHA	0.1971	0.0004	NÃO	NÃO	NÃO
61	CALCINHA	0.0007	0.0012	NÃO	NÃO	NÃO

Legenda: CODIS *Combined DNA Index System*.

4.3. Resultados dos casos com espermatozoides raros

Nos 33 casos que continham raros espermatozoides (tabela 3) foram obtidos um perfil alélico masculino isolado em 22 casos (66,7%). Em 10 casos (30,3%) o perfil alélico obtido foi em forma de mistura do DNA da vítima com o DNA do agressor. E em apenas um caso (3,0%), o caso 11, o perfil alélico obtido foi feminino. Os 22 casos que obtiveram perfil masculino isolado foram inseridos no CODIS.

Tabela 3- Casos que resultaram PSA positivo e espermatozoides raros

NÚMERO	OBJETO/PEÇA	CONCENTRAÇÃO DE DNA HUMANO (ng/μL)	CONCENTRAÇÃO DE DNA MASCULINO (ng/μL)	PERFIL MASCULINO ISOLADO	PERFIL MASCULINO EM MISTURA	PERFIL INSERIDO NO CODIS
2	PRESERVATIVO	0.0017	0.0017	NÃO	SIM	NÃO
3	RETALHO DE BANCO	0.1787	0.2399	SIM	NÃO	SIM
4	BLUSA	0.0181	0.0095	NÃO	SIM	NÃO
5	CALCINHA	0.0342	0.0184	SIM	NÃO	SIM
9	PRESERVATIVO	0.1320	0.1196	SIM	NÃO	SIM
10	PRESERVATIVO	0.0369	0.0489	SIM	NÃO	SIM
11	CALCINHA	4.4340	0.0060	NÃO	NÃO	NÃO
16	CUECA	0.8740	0.3413	NÃO	SIM	NÃO
18	CALCINHA	0.0010	0.0016	SIM	NÃO	SIM
19	CALCINHA	0.7039	0.0203	NÃO	SIM	NÃO
20	BLUSA	0.1444	0.1218	SIM	NÃO	SIM
21	ABSORVENTE	0.0277	0.0319	SIM	NÃO	SIM
22	CALÇA	2.3710	2.1515	SIM	NÃO	SIM
23	CALCINHA	0.0220	0.0158	SIM	NÃO	SIM
26	CALCINHA	0.0062	0.0035	NÃO	SIM	NÃO
27	SHORT	11.2203	12.4722	SIM	NÃO	SIM
33	CALCINHA	0.0017	0.0029	NÃO	SIM	NÃO
37	CALCINHA	0.0137	0.0141	SIM	NÃO	SIM
38	SHORT	2.6952	2.8963	SIM	NÃO	SIM
39	PRESERVATIVO	0.0700	0.0800	SIM	NÃO	SIM
40	CALCINHA	0.1660	0.1640	SIM	NÃO	SIM
42	TECIDO	0.0078	0.0084	NÃO	SIM	NÃO
43	TECIDO	0.3237	0.4302	SIM	NÃO	SIM
44	PRESERVATIVO	0.0468	0.0079	SIM	NÃO	SIM
45	CUECA	0.7819	0.7237	SIM	NÃO	SIM
50	CUECA	0.0024	0.0032	NÃO	SIM	NÃO
51	CALCINHA	16.0954	0.1300	NÃO	SIM	NÃO
52	PRESERVATIVO	0.1113	0.0769	SIM	NÃO	SIM
53	PRESERVATIVO	0.0085	0.0053	SIM	NÃO	SIM
55	CALÇA	5.6234	7.2984	SIM	NÃO	SIM
57	CUECA	0.0192	0.0157	SIM	NÃO	SIM
58	CALCINHA	1.5685	1.3683	SIM	NÃO	SIM
60	CALCINHA	0.1024	0.0506	NÃO	SIM	NÃO

Legenda: CODIS *Combined DNA Index System*.

5. DISCUSSÃO

O sucesso de um exame pericial laboratorial é determinado não apenas pela qualidade da amostra analisada, mas também dos procedimentos laboratoriais empregados. As decisões administrativas em dar

prosseguimento ou não na cadeia de procedimentos costuma ser pautada na probabilidade de sucesso, de forma que resultados preliminares promissores ensejam o prosseguimento, e resultados pouco promissores motivam a interrupção. Resultados negativos em procedimentos de busca por espermatozoides podem ensejar a taxação da amostra como “pouco promissora” pela administração de laboratórios forenses. Porém, o fato da pesquisa de espermatozoide resultar negativo ou raro não significa que não há material genético masculino, pois, outros tipos de células podem ser utilizadas para a obtenção de um perfil alélico masculino, por exemplo, leucócitos e células epiteliais provenientes do ducto ejacatório. Tais circunstâncias também são comuns quando o agressor é vasectomizado, oligospermico ou azoospermico, e neste cenário seu perfil genético ainda pode ser obtido [10]. Neste estudo, 28 dos 61 casos analisados resultaram espermatozoides negativos e destas 13 amostras se mostraram viáveis para o perfilamento masculino.

Nos 14 casos em que o perfil alélico obtido foi em forma de mistura de DNA masculino com DNA feminino, é provável que a mistura na fração espermatozoide tenha ocorrido em razão do carregamento de DNA lisado na etapa inicial da extração diferencial [11].

Os fragmentos dos materiais utilizados nos exames preliminares (presença de PSA e pesquisa de espermatozoide) não foram os mesmos fragmentos utilizados para a obtenção do perfil genético, pois a análise foi realizada por responsáveis/peritos diferentes, desta forma o fragmento utilizado para obtenção do DNA podia conter outros tipos de células.

Quando se tem, após uma quantificação de DNA, um valor muito discrepante entre o DNA humano e o DNA masculino o que se espera é apenas um perfil de DNA feminino. Nos casos n°s 13, 14, 36, 48, 54 e 59 as concentrações de DNA humano são muito maiores que as concentrações de DNA masculino, sendo assim na amplificação o DNA em maior quantidade é favorecido, e o DNA masculino presente é amplificado na mesma proporção do DNA feminino, por competição durante a reação de PCR. No caso n° 12 a concentração de DNA humano e DNA masculino mesmo sendo semelhantes, o perfil genético obtido foi apenas feminino, já que o material de origem era a calcinha da vítima, predominando o DNA dela. No caso n° 25 o perfil genético apenas feminino obtido corrobora os resultados da quantificação indeterminada para o DNA masculino. No caso n° 17 o perfil genético não foi obtido por estar em baixa quantidade de DNA tanto humano quanto DNA masculino [11][12].

Quando o objeto analisado é um preservativo a probabilidade de sucesso em isolar o perfil genético do

agressor é muito maior quando comparado a um objeto proveniente da vítima, como uma calcinha, por exemplo. Pois no próprio material analisado já é possível fazer a separação do material do agressor e da vítima, fazendo uma coleta com *swabs* da parte interna do preservativo (face com material do agressor) e outro *swabs* na parte externa do preservativo (face com material da vítima) [11].

Estudos de validação realizados no Laboratório de DNA do NBB, de acordo com os reagentes e a sensibilidade dos equipamentos existentes no laboratório, determinaram a necessidade de um mínimo de 0,0033ng/μL no resultado de quantificação (o que fornece uma massa aproximada de 50pg de DNA na reação de PCR), para a obtenção de perfil alélico, ainda que parcial.

Quando se trata do CODIS, dos 35 casos em que foi possível isolar o perfil alélico masculino, 31 destes casos (57%) foram inseridos no banco nacional de dados (tab. 1), pois atendiam os critérios estabelecidos para esse fim (se tratava de um perfil alélico masculino isolado). Nestes, havia fortes indicativos de que o perfil era do agressor sexual. Noutros casos, mesmo se obtendo o perfil alélico masculino isolado, não se teve acesso ao boletim de ocorrência com o histórico do caso em questão, logo não havia certeza de que o perfil obtido era do agressor ou de alguém com quem a vítima tenha tido uma relação sexual consentida próximo à data do crime.

Os perfis alélicos obtidos através de peças como cuecas, geralmente não podem ser inseridos no banco de dados, pois não se tem a certeza de que o perfil obtido seja do agressor e não da vítima, quando se trata de vítima do sexo masculino, já que esses casos não apresentavam material referência da vítima para a comparação. Há exceções quando a cueca examinada foi deixada pelo criminoso no local do crime.

A determinação de um perfil genético masculino e a consequente possível indicação da autoria do crime após análise de amostras com espermatozoides ausentes torna necessária a discussão de novas técnicas para tal obtenção, uma vez que os resultados positivos/promissores no presente trabalho indicam que a presença dos espermatozoides não é o único parâmetro a se considerar para a aquisição do perfil genético do infrator. E com novas técnicas o sucesso de isolar apenas o perfil masculino pode ser maior e, assim, mais casos podem ser solucionados.

É sabido que amostras forenses são, em regra, degradadas e exíguas [20]. Evidentemente, as condições da amostra biológica afetarão na quantidade e na qualidade do DNA. Até o momento da pesquisa poucos trabalhos foram feitos sobre a otimização de condições de armazenamento para amostras de agressão sexual

[13], o que denota espaço para futuros trabalhos envolvendo amostras críticas.

6. CONCLUSÃO

Verificou-se ser possível a obtenção de um perfil genético masculino em peças provenientes de crimes sexuais sem a presença de espermatozoides ou mesmo com raros espermatozoides. As concentrações de DNA tanto masculino quanto feminino influenciam na obtenção deste perfil masculino, porém não é uma regra. Quanto às peças analisadas, pode-se concluir que não foi constatada nenhuma interferência quanto ao tipo de peça para uma possível análise e obtenção do perfil genético masculino.

Considerando que as amostras coletadas de vítimas de estupro cuja presença de espermatozoide apresentavam resultados negativos não seriam submetidos a análise de acordo com o procedimento de rotina do laboratório, e o fato de ser detectada a presença de DNA de origem masculina nas amostras, torna-se considerável que estes casos ao invés de serem arquivados após a constatação sejam submetidos a todo processo para a obtenção de um perfil genético masculino.

Como existem homens oligospermos, azoospermos ou mesmo vasectomizados, indicativo na pesquisa de espermatozoides que resultarem negativo, não se deve, portanto, encerrar o caso, já que através desse estudo foi possível a obtenção de perfil genético masculino de uma fração significativa dos casos, oriundo de células epiteliais masculinas presentes nos materiais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os peritos criminais do Núcleo de Biologia e Bioquímica do Instituto de Criminalística de São Paulo, bem como o auxílio da técnica de laboratório Julianna Kesselring Romero.

REFERÊNCIAS

- [1] ABRAPIA. Abuso Sexual: mitos e realidades. *Autores e Agentes e Associados* 3: (2002).
- [2] C.O. Facuri *et. al.* Violência sexual: estudo descritivo sobre as vítimas e o atendimento em um serviço universitário de referência no Estado de São Paulo, Brasil. *Cad. de Saúde Pùb. Esc. Nac. de Saúde Pùb. Sergio Arouca, Fund. Oswaldo Cruz* 29: 889-898 (2013).
- [3] L.C.L. Justino *et. al.* Violência sexual contra adolescentes: notificações nos Conselhos Tutelares. *Rev Gaúcha Enferm* 32: 781-787 (2011).
- [4] Fórum Brasileiro de Segurança Pública. 9º Anuário Brasileiro de Segurança Pública 9: 156 (2015).

- [5] W.R.G. Teixeira. A Importância do *Swab* na Perícia de Estupro. *Rev. IMESC*. **1**: (1998).
- [6] P.J. Abrahão. A perícia do esperma no crime de estupro. *Conteúdo Jurídico* (2014). Retirado em 20/04/2015, de <http://www.conteudojuridico.com.br/?artigos&ver=2.51123&seo=1>.
- [7] M.P. Bueno; T.Y.C. Massuda. Análise de Interferentes na detecção de PSA para Aplicação Forense. *Cad. da Esc. de Saúde* **2**: 66-73 (2014).
- [8] M. Noureddine. Forensic Tests for Semen: What you should know. *Forensic Science* (2011) Retirado em 20/04/2015, de <https://ncforensics.wordpress.com/2011/10/19/forensic-tests-for-semen-what-you-should-know/>.
- [9] G.S. Jacques; A.C. Minervino. Aspectos Éticos e Legais do Banco de Dados de Perfis Genéticos. *Perícia Federal* **4**: 17-20 (2008).
- [10] L. Gusmão. *et. al.* DNA commission of the international society of forensic genetics (ISGF): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *FSI* **157**: 187-197 (2006).
- [11] K.A. De Paula. Análise Molecular Com Y-Strs Em Amostras Biológicas Sem Espermatozoides Coletadas de Vítimas de Estupro. 2011. 79f. *Dissertação (Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia)* Universidade Católica de Brasília (2012).
- [12] S. Lapeña; A. Gaztambide; I. Huarte. Agresión sexual. *Anales Sis San Navarra* **32**: 59-63 (2009).
- [13] R.W. Cotton; M.B. Fisher. Review: Properties of sperm and seminal fluid, informed by research on reproduction and contraception. *FSI Genetics* **8**: 66-77 (2015).
- [14] DNA IQ. DNA IQ System Database Protocol. Promega Corporation. Retirado em 11/04/2017, de <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/dna-iq-system-database-protocol.pdf>.
- [15] EZ1. EZ1 DNA Investigator Kit. Qiagen. Retirado em 11/04/2017, de <https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sample-preparation/ez1-dna-investigator-kit/#productdetails>.
- [16] POWERPLEX FUSION. PowerPlex Fusion System Technical Manual. Promega Corporation. Retirado em 11/04/2017, de <https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-fusion-system-protocol.pdf>.
- [17] POWERPLEX FUSION6C. PowerPlex Fusion6C System Technical Manual. Promega Corporation. Retirado em 11/04/2017, de <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-fusion-6c-system-protocol.pdf>.
- [18] PREPFILER. Prepfil Forensic DNA Extraction Kits. Applied Biosystems. Retirado em 11/04/2017, de http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applie_d_markets_support/documents/generaldocuments/cms_096102.pdf.
- [19] QUANTIFILER TRIO. Quantifiler TRIO DNA Quantification Kit User's Manual. Applied Biosystems. Retirado em 11/04/2017, de http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applie_d_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041395.pdf.
- [20] I.M. Cândido & C.R. Dias Filho. Coleta e preservação dos vestígios biológicos in C.R. Dias Filho & P.A.C Francez. *Introdução à Biologia Forense*. 2018. 2ª edição, Millennium Editora, Campinas/SP