

Classificação semiquantitativa de espermatozoides otimiza a genotipagem de *backlog* de amostras de crimes sexuais

A.L. Cândido^a, N.R. Carvalho^b, P.B. Chaves^b, B. Martinucci^b, N.M.O. Godinho^b, M.F. Mota^{b,*}

^a Universidade Federal de Goiás, Goiânia (GO), Brasil

^b Laboratório de Biologia e DNA Forense, Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues, Superintendência de Polícia Técnico-Científica, Goiânia (GO), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: marianafmota@yahoo.com.br. Tel.: +55-62-32019543.

Recebido em 18/10/2019; Revisado em 09/07/2020; Aceito em 06/08/2020

Resumo

A realização de testes genéticos em vestígios de crimes sexuais pode ser feita com ou sem a análise prévia de espermatozoides por microscopia, que permite inferir a quantidade de espermatozoides na amostra. Para amostras com presença de espermatozoides, a extração diferencial é o protocolo recomendado na etapa de lise celular, pois permite isolar o DNA das células espermáticas (DNA do agressor) do DNA das células da vítima, melhorando assim a recuperação do perfil genético do agressor. Neste trabalho analisamos a relação entre uma classificação semiquantitativa de espermatozoides e o DNA masculino quantificado por qPCR (PCR quantitativo) e a qualidade do perfil genético de amostras de crimes sexuais ocorridos no Estado de Goiás (Brasil). Para tanto foram analisados 93 suabes vaginais com presença de espermatozoides após extração diferencial, seguida de quantificação de DNA via qPCR e genotipagem de marcadores microssatélites de uso forense. Não foi observada relação clara entre os três grupos de contagem de espermatozoides e a razão de DNA masculino e feminino (M:F) nas amostras analisadas. Contudo, constatou-se uma tendência de aumento significativo da quantidade de DNA masculino com o aumento do número de espermatozoides. Esse resultado foi seguido da melhora na qualidade do perfil genético das amostras contendo mais DNA masculino. A contagem de espermatozoides pode ser usada para priorizar amostras a serem analisadas em esforços de genotipagem em massa de vestígios de crimes sexuais que aguardam processamento (*backlog*). Ela aumenta a previsibilidade dos resultados e a taxa de sucesso do exame de DNA.

Palavras-Chave: estupro, espermatozoides, STR, PCR em tempo real, genética forense.

Abstract

Genetic testing of sexual assault kits can be done either with or without prior information on microscopic sperm count analysis, which allows one to infer the quantity of sperm cells present in the sample. For samples containing spermatozoa, the differential DNA extraction protocol is recommended during the lysis step because it separates the DNA of the sperm cells (perpetrator's DNA) from the victim's DNA, thus enhancing the isolation of the perpetrator's genetic profile. In this study we analyzed the relationship between a semiquantitative classification of sperm count analysis and both the male DNA quantified via qPCR (quantitative PCR) and the quality of the genetic profile from sexual assault kits collected in the State of Goiás (Brazil). We analyzed 93 vaginal swabs positive for sperm cells after a differential DNA extraction protocol, followed by qPCR DNA quantification and genotyping of forensically relevant microsatellites loci. There was no evident relationship between the three sperm count groups and the male to female DNA ratio (M:F) in the samples analyzed. Nonetheless, there was a significant trend of increase in the quantity of male DNA with the increase of sperm cells. This result was supported by an improved quality of the genetic profile amplified from the samples containing higher quantities of male DNA. The sperm count step can be used to prioritize samples to be analyzed in projects focusing on the genotyping of the large sexual assault kit backlogs. It improves the predictability of the results and the success rate of the DNA testing.

Keywords: rape, spermatozoa, STR, real-time PCR, forensic genetics.

1. INTRODUÇÃO

A violência sexual é reconhecidamente um sério problema de segurança pública em diversos países, podendo deixar sequelas de curto e longo prazo na saúde física, mental e sexual das vítimas [1]. No Brasil, apenas em 2018, ocorreram 66.041 casos de crimes sexuais, o maior número já registrado, com crescimento de 4,1% e uma média de 180 vítimas por dia [2]. Para a elucidação desses crimes, a genética forense é ferramenta fundamental, pois permite identificar a autoria por meio da análise de vestígios biológicos oriundos de cenas de crime como secreções e vestimentas [3-6].

Nos laboratórios forenses, vestígios relacionados a crimes sexuais podem ser submetidos ou não a exames de triagem de natureza qualitativa para pesquisa de sêmen humano. Dentre os exames de triagem, os mais utilizados são a pesquisa de espermatozoides e a pesquisa de antígeno prostático específico (PSA), os quais analisam, respectivamente, a presença ou ausência do gameta masculino humano por microscopia óptica e da proteína prostática específica do sêmen humano por teste imunocromatográfico [4,7,8]. Geralmente, os dois exames são utilizados em associação, mas a pesquisa de espermatozoides é mais informativa por ajudar a prever, com maior confiança, a presença de material genético do agressor na amostra [7,8].

Apesar da natureza qualitativa do exame de pesquisa de espermatozoides por microscopia óptica, é possível realizar uma mensuração semiquantitativa do número de espermatozoides na amostra como forma de direcionar e otimizar os procedimentos subsequentes de genotipagem molecular de marcadores STR (*Short Tandem Repeats*) [8-10]. Neste contexto, após confirmação da presença e quantidade de espermatozoide na amostra, pode-se optar por realizar o procedimento de extração diferencial de DNA, no qual é possível separar o DNA da fase espermática (FE) do fase não espermática (FNE) [10,11].

Após a extração, realiza-se a quantificação de DNA total humano e de DNA masculino [11,12]. Sendo assim, espera-se que amostras com maior quantidade de espermatozoides apresentem uma maior quantidade de DNA masculino, o que tende a facilitar o isolamento do perfil genético do agressor da fase espermática.

Com o objetivo de otimizar o fluxo de trabalho em laboratórios forenses e melhorar a obtenção do perfil genético do agressor em amostras de crimes sexuais, esse estudo buscou testar a relação entre a classificação semiquantitativa de espermatozoides que passou a ser adotada no Laboratório de Biologia e DNA Forense (LBDF) da Superintendência de Polícia Técnico-Científica do Estado de Goiás (SPTC/GO) com a quantidade de DNA masculino e a razão de DNA masculino/feminino de amostras provenientes de crimes sexuais ocorridos no Estado de Goiás.

2. METODOLOGIA

2.1. Classificação semiquantitativa de espermatozoides

Seguindo métodos semelhantes previamente publicados, o LBDF-SPTC passou a adotar a seguinte classificação de acordo com a quantidade de espermatozoides por lâmina (sptz/lam): i) raros (de 1 a 5 sptz/lam); ii) moderados (de 6 a 10 sptz/lam); e iii) numerosos (11 ou mais sptz/lam) [8].

2.2. Microscopia óptica

Para a pesquisa de espermatozoides por microscopia óptica, as lâminas foram coradas pela metodologia de coloração *Christmas Tree* [8]. As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico com aumento de 200x e 400x e classificadas de acordo com o número de espermatozoides em um dos grupos amostrais: raros, moderados ou numerosos.

2.3. Grupo amostral e critérios de inclusão

As amostras foram selecionadas dos casos de crimes sexuais com vítimas do sexo feminino ocorridos em Goiás, sendo utilizados os seguintes critérios de inclusão: (a) secreção vaginal com presença de espermatozoides e (b) existência de exame de classificação semiquantitativa de espermatozoides. Até julho de 2018, o LBDF havia emitido 2.157 laudos com resultado positivo para presença de espermatozoides. Desse total, 93 amostras dispunham de classificação semiquantitativa, sendo 51 classificadas em raros, 21 em moderados e 21 em numerosos.

2.4. Extração de DNA

O DNA foi extraído com um protocolo de extração diferencial de DNA. Inicialmente 195 μ L de tampão de lise pH 7,5 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl e SDS a 2%) e 5 μ L de Proteinase K a 20 mg/mL foram adicionados às amostras. Os tubos foram incubados em banho-seco a 56 °C com agitação de 750 RPM por 1h. As amostras foram então centrifugadas durante 5 minutos a 14.000 g. A fase líquida (FNE) foi transferida para um novo tubo e armazenada (não analisada no presente estudo). O precipitado restante (FE) foi lavado com água ultrapura por três vezes. Após a remoção do sobrenadante final, foram adicionados ao precipitado 500 μ L de tampão de lise do kit *PrepFiler Express*TM (*Applied Biosystems*[®]) e 5 μ L de DTT (ditiotreitól) a 1 M. As amostras foram incubadas em banho-seco a 70 °C com agitação de 750 RPM por 40 minutos [3]. Após a incubação, a solução foi transferida para conjuntos *LySep/Sample Tube* do kit *PrepFiler Express*TM e purificadas no equipamento

Automate Express™ (Applied Biosystems®) conforme as recomendações do fabricante [13,14].

2.5. Quantificação de DNA (qPCR)

A quantificação do DNA foi realizada por meio de PCR quantitativo no equipamento 7500 *real-time PCR System* (Applied Biosystems®), utilizando-se o kit *Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit* (Applied Biosystems®) de acordo com o protocolo do fabricante. Os dados foram coletados através do *software* de análise de resultados *HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2* (Applied Biosystems®). As concentrações de DNA total humano e masculino das FEs foram calculadas, respectivamente, com os valores de concentração do alvo autossômico pequeno (*Small*) e do cromossomo Y [15]. A razão entre o DNA masculino e feminino (M:F) foi calculada com a seguinte equação:

$$[Y]/[Y] : ([Small]-[Y])/[Y] \quad (1)$$

Onde [Y] é a concentração de DNA masculino e [Small] é a concentração de DNA total da amostra. Note que o primeiro termo da razão ($[Y]/[Y]$) é sempre igual a 1.

2.6. Amplificação do DNA (PCR)

Os perfis genéticos das FEs foram obtidos em termocicladores Veriti® (Applied Biosystems®), utilizando-se o kit de amplificação *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems®), que amplifica 24 locos genéticos. As reações de amplificação do DNA (PCR) foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, com as amostras normalizadas para uma massa de 0,5 ng de DNA e 30 ciclos de amplificação [16].

2.7. Análise de STR

Os 24 locos amplificados de cada amostra foram separados por eletroforese capilar no analisador genético *ABI 3500®* (Applied Biosystems®) com o *ABI 3500 Series Data Collection Software 3* (Applied Biosystems®). Um microlitro do produto de PCR amplificado foi misturado com 0,4 µL de *GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0* (Applied Biosystems®) e 9,6 µL de formamida *HiDi™* (Applied Biosystems®). Os perfis genéticos obtidos foram analisados no *GeneMapper® ID-X Software v.1.4* (Applied Biosystems®) usando um limiar analítico de 175 RFU (*Relative Fluorescence Units*).

2.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism v.7.0* (GraphPad Software Inc). Para se avaliar a diferença entre as médias da razão de DNA masculino/feminino obtida em cada grupo amostral e a quantidade de DNA masculino (em ng) quantificados em cada grupo utilizou-se o teste *one-way ANOVA* com teste

de Tukey *a posteriori*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Razão entre DNA masculino e feminino (M:F)

Para a obtenção da razão entre o DNA masculino/feminino (M:F) foram utilizados os valores de concentração do DNA total da amostra e o DNA do cromossomo Y. Nos casos em que a concentração de DNA masculino ([Y]) é superior à concentração de DNA total ([Small]), a razão calculada é negativa. Isso se deve a uma imprecisão da reação de qPCR, que estima o C_T (*Cycle Threshold*) do DNA total levemente deslocado à direita do C_T do DNA masculino, quando eles deveriam ser idênticos. Nestes casos, a quantidade de DNA feminino (F) foi considerada igual a zero pois, de fato, todo o DNA da amostra é exclusivamente de origem masculina.

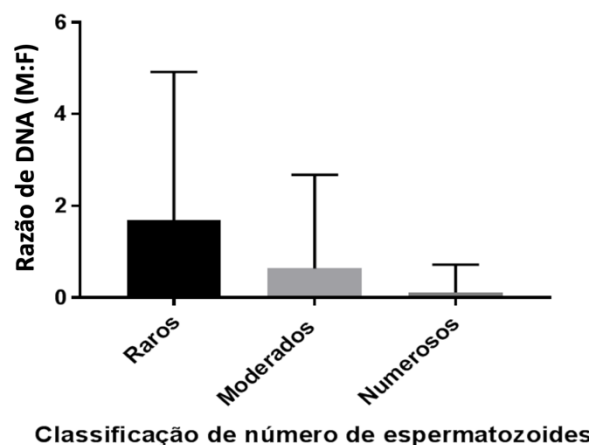


Figura 1. Razão de DNA masculino em relação ao DNA feminino para cada grupo amostral (M:F). Como o valor de M é sempre igual a 1, na prática o eixo Y mostra a concentração relativa de DNA feminino.

No grupo classificado como raros, foi obtida uma média de M:F (\pm desvio padrão) de 1:1,69 (\pm 1:3,23), nos moderados uma média de 1:0,63 (\pm 1:2,04) e nos numerosos, 1:0,11 (\pm 1:0,60). Embora a ANOVA indique marginalmente uma diferença entre os grupos ($p = 0,048$), as comparações par-a-par entre os grupos não foram significativas no teste de Tukey ($0,056 < p < 0,772$) (Fig. 1).

Para todos os grupos nota-se um elevado desvio padrão, o que provavelmente explica as diferenças não serem significativas entre eles. No entanto, os altos valores de desvio já eram esperados devido à variação na coleta entre as vítimas e o fato de a classificação de números de espermatozoides adotada ser subdividida em apenas três categorias contínuas.

3.2. Quantidade de DNA masculino

Em relação à quantidade de DNA masculino, foi possível observar uma maior concentração de DNA no grupo classificado como numerosos ($20,47 \pm 24,27$ ng) comparado ao grupo moderados ($2,05 \pm 3,71$ ng, $p < 0,001$) e raros ($0,24 \pm 0,57$ ng, $p < 0,001$) (Fig. 2).

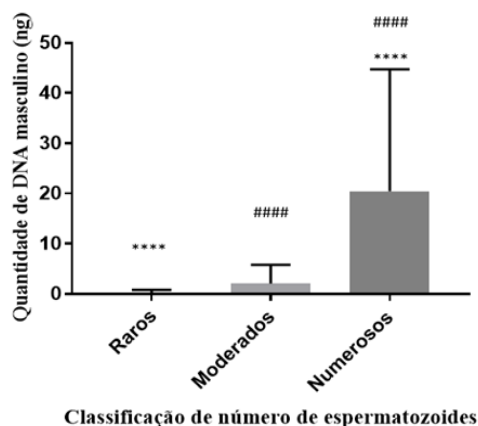


Figura 2. Distribuição da quantidade de DNA masculino em nanogramas (ng) obtido em cada grupo amostral. Asteriscos (****) e hashtags (#####) identificam as comparações par-a-par do teste de Tukey que foram significativas ($p < 0,05$).

No entanto, mesmo que a média do grupo de moderados seja cerca de 8 vezes maior que a encontrada no grupo de raros, não foi observada diferença significativa entre a quantidade de DNA masculino obtido entre o grupo de raros ($0,24 \pm 0,57$ ng) e moderados ($2,05 \pm 3,71$ ng, $p = 0,775$). A grande variação obtida nas amostras do mesmo grupo provavelmente se deve aos mesmos fatores já mencionados anteriormente.

3.3. Perfis genéticos

Os perfis genéticos obtidos nas FEs foram classificados em quatro tipos: i) únicos masculinos - nos quais é possível identificar apenas o material genético do agressor; ii) mistura - nos quais o material genético do agressor e da vítima apresentam sinal de fluorescência (RFU) similares; iii) mistura majoritário masculino - nos quais há a presença do material genético da vítima e do agressor, estando o sinal masculino em níveis de fluorescência claramente mais altos do que o feminino; iv) mistura majoritário feminino - nos quais há a presença do material genético da vítima e do agressor, estando o sinal feminino em níveis de fluorescência claramente mais altos do que o masculino (Tab. 1).

A partir dos perfis obtidos, foi possível observar uma compatibilidade entre a classificação de espermatozoides utilizada e os resultados da quantificação do DNA. Os percentuais mostram qualitativamente que a eficiência no isolamento do perfil genético do agressor é proporcional à quantidade de espermatozoides na amostra, revelando que

a classificação semiquantitativa contribui para a previsibilidade dos resultados.

Tabela 1. Porcentagem dos tipos de perfis genéticos obtidos em relação à classificação semiquantitativa de espermatozoides.

%	Único Masculino	Mistura	Mistura: majoritário masculino	Mistura: majoritário feminino
Raros	1,96%	37,25%	41,17%	19,60%
Moderados	38,09%	4,76%	57,14%	0%
Numerosos	76,19%	4,76%	19,04%	0%

4. DISCUSSÃO

Em casos de violência sexual, a detecção de sêmen, e mais especificamente, espermatozoides em suabes vaginais podem ser consideradas provas irrefutáveis do contato sexual [17]. Contudo, amostras de secreção vaginal coletadas de vítimas de estupro podem conter poucos espermatozoides e/ou um grande número de outras células, como células epiteliais da vítima e até fungos e bactérias que podem dificultar a amplificação do genótipo do agressor [18]. Neste contexto, exames de triagem podem ser uma forma de otimizar os procedimentos de análise molecular dessas amostras biológicas.

Allard *et al.* [19] sugerem que a presença de espermatozoides seja confirmada por meio de microscopia óptica com ampliação de 400x, classificando a distribuição de espermatozoides da seguinte forma: de 1 a 5 espermatozoides encontrados (poucos/raros), difíceis de encontrar (+), alguns nos mesmos campos focais como fáceis de encontrar (++), muitos ou alguns na maioria dos campos (+++) e muitos em todos os campos (++++). Metodologia semelhante foi utilizada por muito tempo no LBDF. Porém, recentemente, nosso laboratório, decidiu adotar uma classificação mais objetiva, baseada na contagem de espermatozoides, conforme já apresentado.

Ainda que contenham espermatozoides, os vestígios coletados de fluidos corporais, como secreção vaginal, costumam apresentar misturas de material biológico do agressor e da vítima. Assim, para a separação do DNA do agressor, é recomendável a realização da extração diferencial e a quantificação [9]. Nas amostras que apresentam mistura de DNA masculino e feminino, três aspectos importantes devem ser considerados: i) a quantidade específica de DNA masculino; ii) as quantidades relativas de DNA humano e DNA masculino; e iii) a presença de inibidores de PCR [20].

Barbisin *et al.* [21] mostraram que ao utilizar uma metodologia de extração orgânica sem separação de fases, é possível apenas a identificação do contribuinte masculino cujas proporções de DNA M:F foram inferiores a 1:10. Sem a utilização da extração diferencial, houve ocorrência de alelos masculinos minoritários em relação aos alelos

femininos ou perfis genéticos femininos únicos. Neste estudo, utilizando-se a extração diferencial e análise das frações espermáticas, foram obtidas razões M:F mais elevadas (até 1:6), sobretudo nas classificações de espermatozoides moderados e numerosos (até 1:4), o que resultou em uma proporção maior de perfis genéticos masculinos únicos ou de misturas com perfis masculinos interpretáveis (Tab. 1).

A quantificação de DNA evidenciou que as amostras com classificação de espermatozoides numerosos possuíam maior concentração de DNA masculino em relação aos outros dois grupos. Alderson *et al.* também demonstraram que a extração diferencial para amostras contendo espermatozoides resulta em mais DNA masculino na FE [22]. No entanto, embora esperava-se uma relação linear entre o número de espermatozoides por lâmina nas classes e a quantidade de DNA masculino na quantificação, não foi possível observar diferença significativa entre as classificações de raros e moderados. Possíveis razões para esse resultado são a grande variância observada nessas classes e o uso de uma classificação contínua de três categorias que não exibem uma descontinuidade real entre si.

Embora o elevado número de casos de crimes sexuais sem vestígios analisados tenha levado alguns autores a recomendar que os laboratórios não realizem a contagem de espermatozoides, optando pelo exame de DNA direto, de forma padronizada, com os mesmos métodos e no maior número de amostras possível [22,23], sabemos que essa abordagem pode não ser viável para muitos laboratórios. Isso se deve principalmente ao gasto com equipamentos de automação e a necessidade de uma equipe técnica numerosa para executar todos os procedimentos, da manipulação da amostra à redação do laudo.

Neste sentido, o presente estudo apresenta uma alternativa, ao demonstrar que, mesmo que a pesquisa de espermatozoides demande mais tempo inicialmente, ela pode economizar tempo no médio prazo. Com ela, os laboratórios podem responder às seguintes perguntas antes de prosseguir com uma estratégia de genotipagem em larga escala: i) Possuímos a capacidade de testar todas as amostras diretamente? ii) Caso contrário, quais amostras serão prioritariamente direcionadas para o exame de DNA? iii) No exame de DNA será usada sempre a mesma metodologia de extração para todas as amostras? iv) Queremos priorizar a obtenção de perfis genéticos com qualidade para inserção em Bancos de Dados?

Os dados apresentados demonstram que a pesquisa de espermatozoides, ferramenta de baixo custo e de fácil acesso, permite direcionar o tipo de extração de DNA e aumenta a previsibilidade dos resultados da genotipagem de STR. Além disso, a confirmação da presença de sêmen contribui na tipificação do crime já que a presença de

espermatozoides no corpo da vítima é forte indício de ato sexual.

Dessa forma, para a ausência de gametas masculinos, recomenda-se a realização de uma extração comum, priorizando a amplificação do haplótipo do cromossomo Y quando a razão M:F for elevada, por ser uma metodologia relativamente rápida e eficaz. Por outro lado, quando houver presença de espermatozoides, a utilização da extração diferencial possibilita a amplificação de perfis genéticos masculinos autossômicos de melhor qualidade e, consequentemente, acelera a interpretação dos resultados e aumenta a contribuição do exame de DNA para a solução de crimes sexuais.

5. CONCLUSÃO

A classificação semiquantitativa de espermatozoides tem uma relação direta com a quantidade de DNA do agressor obtida em amostras de crimes sexuais. Como pôde ser observado neste trabalho, quanto maior a quantidade de espermatozoides, maior a quantidade de DNA masculino e, consequentemente, maior a possibilidade de se obter o perfil genético do agressor de forma isolada, permitindo a inserção em Bancos de Perfis Genéticos e a autoria do crime. Além disso, em projetos de processamento em massa de amostras armazenadas (*backlog*), resultados prévios de quantificação de espermatozoides podem contribuir para a priorização de amostras que tendem a produzir perfis genéticos de melhor qualidade. Assim, a análise semiquantitativa otimiza o exame de DNA, tornando-o mais previsível e eficiente, contribuindo para dar celeridade à elucidação de crimes sexuais.

AGRADECIMENTOS

A todos os Peritos Criminais e demais servidores do Laboratório de Biologia e DNA Forense e da Superintendência de Polícia Técnico-Científica de Goiás que contribuíram na coleta e análise das amostras utilizadas neste estudo, em especial à Perita Criminal Grasielly de Oliveira Lázaro e Arão pela participação nas discussões e na produção de dados na fase inicial desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization. Preventing intimate partner and sexual violence against women: taking action and generating evidence. *World Health Organization* (2010). Retirado em 05/07/2020, de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44350>.
- [2] Fórum Brasileiro de Segurança Pública. Anuário brasileiro de segurança pública. *Fórum Brasileiro de Segurança Pública* 13^a Ed., (2019). Retirado em

- 04/07/2019 de <http://forumseguranca.org.br/anuario-brasileiro-seguranca-publica/>.
- [3] Rede Integrada de Perfis Genéticos. Manual de Procedimentos Operacionais da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos. *Diário Oficial da União*, v.88, seção 1, p. 40 (2015). Retirado em 17/05/2018 de <http://www.justica.gov.br/sua-seguranca/ribpg>.
- [4] J.A.Velho; K.A. Costa; C.T.M. Damasceno, Locais de crime: dos vestígios à dinâmica criminosa. *Millenium* 3° ed. (2010).
- [5] N.R Carvalho *et al.* The contribution of DNA databases for stored sexual crimes evidences in the central of Brazil. *Forensic Sci. Int. Genet.* 46: 102235 (2020).
- [6] M. Toselli; A.C. Pacheco; C.R. Dias Filho. PSA positivo, espermatozoides ausentes: vale a tentativa de obtenção de perfil genético masculino? *Rev. Bras. Crimin.* 8: 51-57 (2019).
- [7] A. Andreassa *et al.* Introdução à biologia forense. *Millenium* 2° ed. (2016).
- [8] M.C.T. Sawaya; M.R.S. Rolim. Manual prático de medicina legal no laboratório. *Juruá* 2° ed (2009).
- [9] J.M. Butler. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. *Academic Press* 1° ed (2011).
- [10] T. Strachan; A.P. Read. Genética Molecular Humana. *Artmed*, 2° ed (2002).
- [11] J.M. Butler. Fundamentals of Forensic DNA Typing. *Academic Press*, 1° ed (2009).
- [12] M.C.T. Sawaya; M.R.S. Rolim. Antígeno específico da próstata em fluidos biológicos: aplicação forense. *Visão Acadêmica* 5: 109-116 (2004).
- [13] Applied Biosystems. PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits. *Thermo Fisher Scientific* 4442699: rev. B (2010). Retirado em 04/11/2018 de <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>.
- [14] Applied Biosystems. AutoMate Express™ Instrument User Guide. *Thermo Fisher Scientific* 4441982: rev.F (2018). Retirado em 04/11/2018 de <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>.
- [15] Applied Biosystems. Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits: User Guide. *Thermo Fisher Scientific* 4485354: rev. H (2018). Retirado em 04/11/2018 de <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>.
- [16] Applied Biosystems. GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits: User Guide. *Thermo Fisher Scientific* 4477604: rev. E (2016). Retirado em 04/07/2020 de <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>.
- [17] P. Gill; L. Fereday; N. Morling; P.M. Schneider. The evolution of DNA databases recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci. Int.* 156: 242-244 (2006).
- [18] K.A de Paula. Análise molecular com Y-STRS em amostras biológicas sem espermatozoides coletadas de vítimas de estupro. *Dissertação de Mestrado* (Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília, Brasília (2011).
- [19] J.E Allard *et al.* The collection of data from findings in cases of sexual assault and the significance of spermatozoa on vaginal, anal and oral swabs. *Sci. Justice* 37: 99-108 (1997).
- [20] L. Romero-Montoya *et al.* Relationship of spermatoscopy, prostatic acid phosphatase activity and prostate-specific antigen (p30) assays with further DNA typing in forensic samples from rape cases. *Forensic Sci. Int.* 206: 111-118 (2011).
- [21] M. Barbisin *et al.* Developmental Validation of the Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit for Simultaneous Quantification of Total Human and Human Male DNA and Detection of PCR Inhibitors in Biological Samples. *J. Forensic Sci.* 54: 305-3019 (2009).
- [22] G. Alderson *et al.* Inferring the presence of spermatozoa in forensic samples based on male DNA fractionation following differential extraction. *Forensic Sci. Int. Genet.* 36: 225-232 (2018).
- [23] R. Campbell, *et al.* The national problem of untested sexual assault kits (SAKs): scope, causes, and future directions for research, policy, and practice. *Trauma Violence Abuse* 18: 363-376 (2015).

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela. Resultados obtidos por amostra, classificação semiquantitativa de espermatozoides definida no LBDF, quantidade de DNA masculino na fração espermática (FE), razão de DNA masculino e feminino na FE e perfil genético obtido da FE no exame de DNA.

Amostra	Classificação de espermatoz. LBDF	Quantidade de DNA masculino na FE	Razão DNA M:F na FE	Perfil genético obtido na FE
1	raros	0,4628	01:01,2	perfil genético de mistura
2	raros	0,0207	01:13,2	perfil genético de mistura
3	raros	0,0134	01:01,5	perfil genético de mistura
4	raros	0,0578	1:-0,0398	mistura com perfil majoritário masculino
5	raros	0,0403	01:00,6	perfil genético de mistura
6	raros	0,3795	01:00,6	mistura com perfil majoritário feminino
7	raros	0,0448	01:00,1	mistura com perfil majoritário masculino
8	raros	0,0087	01:03,6	perfil genético de mistura
9	raros	0,0142	01:00,5	perfil genético de mistura
10	raros	0,1085	01:00,2	mistura com perfil majoritário masculino
11	raros	0,2277	01:00,2	mistura com perfil majoritário masculino
12	raros	0,2715	1:-0,0390	mistura com perfil majoritário masculino
13	raros	0,6912	01:00,8	perfil genético de mistura
14	raros	0,1044	1:-0,1159	mistura com perfil majoritário masculino
15	raros	1,9706	01:00,3	mistura com perfil majoritário masculino
16	raros	0,1015	1:-0,3350	mistura com perfil majoritário masculino
17	raros	0,0071	01:01,4	perfil genético de mistura
18	raros	0,113	01:04,7	mistura com perfil majoritário feminino
19	raros	0,0322	01:03,2	mistura com perfil majoritário feminino
20	raros	0,0077	01:01,8	perfil genético de mistura
21	raros	0,0224	01:04,9	mistura com perfil majoritário feminino
22	raros	0,1753	01:00,2	mistura com perfil majoritário feminino
23	raros	0,0087	01:04,4	mistura com perfil majoritário feminino
24	raros	0,2286	01:03,9	mistura com perfil majoritário feminino
25	raros	0,0135	01:01,1	perfil genético de mistura
26	raros	0,1122	01:00,6	perfil genético de mistura
27	raros	0,0023	01:00,2	perfil genético de mistura
28	raros	0,0061	01:00,3	perfil genético de mistura
29	raros	3,6028	1:-0,9986	mistura com perfil majoritário feminino
30	raros	0,0032	01:17,3	mistura com perfil majoritário feminino
31	raros	0,1264	01:00,2	mistura com perfil majoritário masculino
32	raros	0,0338	01:00,9	mistura com perfil majoritário masculino
33	raros	0,0876	01:01,7	perfil genético de mistura
34	raros	0,0299	1:-0,0033	mistura com perfil majoritário masculino
35	raros	0,0186	01:00,7	perfil genético de mistura
36	raros	0,5414	01:00,5	perfil genético de mistura
37	raros	0,2247	01:00,6	mistura com perfil majoritário masculino
38	raros	0,0169	01:05,0	mistura com perfil majoritário masculino
39	raros	0,0379	01:01,1	perfil genético de mistura
40	raros	0,306	01:00,5	mistura com perfil majoritário masculino
41	raros	0,6957	01:00,0	mistura com perfil majoritário masculino
42	raros	0,3312	01:00,2	mistura com perfil majoritário masculino
43	raros	0,0137	01:00,8	perfil genético de mistura
44	raros	0,052	01:00,3	mistura com perfil majoritário masculino
45	raros	0,497	1:-0,0887	mistura com perfil majoritário masculino
46	raros	0,3407	01:00,0	mistura com perfil majoritário masculino
47	raros	0,1648	01:00,1	mistura com perfil majoritário masculino

Tabela (continuação). Resultados obtidos no projeto por amostra classificação semiquantitativa de espermatozoides definida no LBDF, quantidade de DNA masculino na fração espermática (FE), razão de DNA masculino e feminino na FE e perfil genético obtido da FE no exame de DNA.

Amostra	Classificação de espermatoz. LBDF	Quantidade de DNA masculino na FE	Razão DNA M:F na FE	Perfil genético obtido na FE
48	raros	0,0628	01:00,3	perfil genético único masculino
49	raros	0,003	01:00,6	perfil genético de mistura
50	raros	0,0439	01:06,9	mistura com perfil majoritário feminino
51	raros	0,0238	01:00,8	mistura com perfil majoritário masculino
52	moderados	1,1297	01:00,2	perfil genético único masculino
53	moderados	0,19	01:00,3	mistura com perfil majoritário masculino
54	moderados	7,4584	01:00,1	mistura com perfil majoritário masculino
55	moderados	1,7387	01:00,4	perfil genético único masculino
56	moderados	15,1043	1:-0,0373	mistura com perfil majoritário masculino
57	moderados	2,9011	01:00,2	perfil genético único masculino
58	moderados	0,1713	01:09,5	perfil genético único masculino
59	moderados	1,0596	01:00,4	mistura com perfil majoritário masculino
60	moderados	1,1992	01:00,1	perfil genético de mistura
61	moderados	8,8193	1:-0,0100	perfil genético único masculino
62	moderados	0,2669	01:00,1	perfil genético único masculino
63	moderados	0,1503	01:00,6	mistura com perfil majoritário masculino
64	moderados	0,0795	01:00,2	mistura com perfil majoritário masculino
65	moderados	0,8182	01:00,0	mistura com perfil majoritário masculino
66	moderados	0,461	01:00,2	perfil genético único masculino
67	moderados	0,2556	01:00,2	mistura com perfil majoritário masculino
68	moderados	0,5268	01:00,4	mistura com perfil majoritário masculino
69	moderados	0,0103	1:-0,1456	mistura com perfil majoritário masculino
70	moderados	0,1515	01:00,6	mistura com perfil majoritário masculino
71	moderados	0,2834	01:00,0	mistura com perfil majoritário masculino
72	moderados	2,0177	1:-0,1604	perfil genético único masculino
73	numerosos	49,956	01:00,0	perfil genético único masculino
74	numerosos	1,4159	1:-0,1057	perfil genético único masculino
75	numerosos	3,3046	1:-0,0247	perfil genético único masculino
76	numerosos	12,0866	1:-0,2829	perfil genético único masculino
77	numerosos	8,6043	1:-0,0568	perfil genético único masculino
78	numerosos	0,412	1:-0,2607	perfil genético único masculino
79	numerosos	21,1814	01:00,1	perfil genético único masculino
80	numerosos	81,4853	01:00,2	perfil genético único masculino
81	numerosos	4,0747	01:00,3	perfil genético único masculino
82	numerosos	2,7897	01:00,1	perfil genético único masculino
83	numerosos	59,0967	01:00,2	perfil genético único masculino
84	numerosos	3,476	01:00,1	mistura com perfil majoritário masculino
85	numerosos	33,2458	1:-0,6543	perfil genético único masculino
86	numerosos	10,0386	01:02,6	perfil genético único masculino
87	numerosos	3,6582	01:00,2	mistura com perfil majoritário masculino
88	numerosos	29,196	01:00,1	mistura com perfil majoritário masculino
89	numerosos	9,5599	1:-0,1313	mistura com perfil majoritário masculino
90	numerosos	7,6244	01:00,1	perfil genético de mistura
91	numerosos	0,4227	1:-0,1138	perfil genético único masculino
92	numerosos	2,212	01:00,1	perfil genético único masculino
93	numerosos	55,5971	1:-0,1514	perfil genético único masculino