

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VICTOR SANTOS STANGE

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO
CROMOSSOMO Y PARA DETECÇÃO DE DNA MASCULINO
EM VÍTIMAS DE VIOLÊNCIA SEXUAL NO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO

Vitória

2014

VICTOR SANTOS STANGE

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO
CROMOSSOMO Y PARA DETECÇÃO DE DNA MASCULINO
EM VÍTIMAS DE VIOLÊNCIA SEXUAL NO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.
Orientador: Prof^o. Dr. Iuri Drumond Louro

VITÓRIA

2014

VICTOR SANTOS STANGE

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO CROMOSSOMO Y PARA DETECÇÃO DE DNA MASCULINO EM VÍTIMAS DE VIOLÊNCIA SEXUAL NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisição parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 24 de janeiro de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Iuri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a Dr^a Greiciane Gaburro Paneto
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a Dr^a. Cintia Fridman Rave
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Departamento de Ciências Biológicas, ao Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela possibilidade de desenvolver esse trabalho;
- À Polícia Civil do Estado do Espírito Santo pela possibilidade de desenvolver esse trabalho;
- Ao professor Iuri Drumond Louro, pela orientação, pelos ensinamentos e pelo voto de confiança ao abrir nova linha de pesquisa;
- Às professoras Dr^a Greiciane Gaburro Paneto e Dr^a Cintia Fridman Rave, por aceitarem compor a banca examinadora;
- Aos meus pais Alfredo e Ana, pelo apoio e constante incentivo, pelo amor e pela dedicação incondicionais;
- À Clara, pelo amor, compreensão, paciência e pela grande ajuda no laboratório e na dissertação;
- À toda a minha família, pelo apoio e pela torcida;
- À toda equipe do Laboratório de Toxicologia da PCES pela cooperação, em especial a Dr^a Josideia Mendonça, Dr Fabrício Pelicao, Jauber Pissinate, Dr^a Maria das Graças Corrêa de Farias , Daniela De Paula, Raquel L. Hastenreiter e Graziany Leite Moreira Marques;
- A todos os colegas de laboratório que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos colegas da Polícia Civil do ES, pelo apoio e incentivo.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

RESUMO

A agressão sexual ignora as barreiras culturais, classes sociais, níveis socioeconômicos e limitações pessoais. Os casos de estupro, homicídio sexual e outras formas de abuso sexual têm sido reconhecidos como problema de saúde pública. Esses casos vêm sendo crescentemente visados pelas ciências forenses, com o objetivo de desenvolver estratégias mais eficientes de identificação e penalização dos culpados. Biomarcadores seminais já vêm sendo usados na detecção de sêmen em amostras vaginais em casos de violência sexual mas em alguns casos a mistura dos fluidos biológicos resulta na mistura de tipos sorológicos impossibilitando a identificação do agressor. Desde 1985, o DNA passou a ser empregado como ferramenta de identificação, trazendo avanços e resolvendo muitos casos criminais e cíveis. A problemática atual na Polícia Civil do Espírito Santo é que para a realização dos testes genéticos (genotipagem por STR), é essencial a detecção de espermatozóides ou PSA nas amostras, servindo como um teste de triagem. Mesmo quando os espermatozóides são ausentes, vários tipos de células não espermáticas são deixados pelo perpetrador (epiteliais, leucócitos, células germinativas imaturas, etc.) e, apesar de não serem extraídas pelo método diferencial, ainda representam fonte viável de DNA para análise. Objetivando-se identificar a presença de DNA masculino em amostras de mulheres vítimas de violência sexual foram analisadas 132 amostras. Utilizando seis marcadores moleculares específicos do cromossomo Y e as técnicas de PCR e análise em gel de poliacrilamida, foi possível identificar 19 amostras promissoras para a genotipagem apesar de terem SC e PSA negativos. Os marcadores AMEL Y, SRY D&E e DYS270 apresentaram altas taxas de acerto, sensibilidade, especificidade e exatidão. Com isso, verificou-se que o trabalho proposto apresenta bom grau de confiabilidade, dando novas perspectivas para a triagem de amostras. Os resultados obtidos fornecem mais informações sobre algumas lacunas das análises forenses envolvendo amostras de crime sexual no estado do Espírito Santo.

PALAVRAS-CHAVE: Crime sexual. Marcadores moleculares de Y. Detecção de DNA exógeno. Correlação genótipo : espermatozóide/PSA.

ABSTRACT

Sexual assault ignores cultural barriers, social class, socioeconomic and personal limitations. Cases of rape, murder and other forms of sexual abuse have been recognized as a health problem. These cases have been targeted by the forensic sciences, with the goal of developing more effective strategies for the identification and punishment of aggressors. Seminal biomarkers have already being used for detection of sperm in vaginal samples in cases of sexual violence, but in some cases biological fluids represent a mixture of serological types, making it impossible to identify the perpetrator. Since 1985, DNA is used as a tool for personal identification, bringing progress and helping solve many criminal and civil cases. The current problems in the Civil Police of Espírito Santo is that for the realization of genetic testing (STR genotyping), it is essential that sperm or PSA are detected in the samples, during the sample screening process . However, even when sperm cells are absent, various types of non-sperm cells are left by the perpetrator (epithelial cells, leukocytes, immature germ cells, etc.) and, despite not extracted by differential methods, they still represent a viable source of DNA for analysis. Aiming to identify the presence of male DNA in samples of women victims of sexual violence, we analyzed 132 sexual abuse samples. Using six specific molecular markers for the Y chromosome, PCR analysis and polyacrylamide gels, it was possible to identify 19 positive samples, which were negative for SC and PSA. Primers AMEL Y, SRY D&E and DYS270 showed high score rates, sensitivity, specificity and accuracy, suggesting that this new method presents good reliability and gives new perspectives for the police sample screening process, providing more information about forensic samples involving sexual crimes in the Espírito Santo State, Brazil.

KEYWORDS: Sexual Crime. Y-chromosome Molecular markers. Detection of foreign DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cromossomo Humano X e Y	19
Figura 2 - Representação do cromossomo Y	21
Figura 3 - Gel de poliacrilamida 7% da PCR do marcador AMEL Y	44
Figura 4 - Gel de poliacrilamida 7% da PCR do marcador G66153	44
Figura 5 - Gel de poliacrilamida 7% da PCR do marcador DXYS96	45
Figura 6 - Gel de poliacrilamida 7% da PCR do marcador SRY F&G	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados na amplificação dos fragmentos	38
Tabela 2 - Tempo de corrida em gel	39
Tabela 3 - Chave para cálculo de especificidade, sensibilidade e exatidão	41
Tabela 4 - Concentrações ideais de reagentes para as reações de amplificação.	43
Tabela 5 - Condições ideais de temperatura/tempo para as reações de amplificação	43
Tabela 6 - Amplificação dos marcadores nas amostras negativas para SC e PSA	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Composição do grupo amostral	35
Gráfico 2 - Valores de sensibilidade, especificidade e exatidão para as 132 amostras	46
Gráfico 3 - Especificidade de cada marcador em comparação com SC e PSA	47
Gráfico 4 - Sensibilidade de cada marcador em comparação com SC e PSA	47
Gráfico 5 - Exatidão de cada marcador em comparação com SC e PSA	48
Gráfico 6 - Especificidade de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de vítimas vivas	50
Gráfico 7 - Sensibilidade de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de vítimas vivas	50
Gráfico 8 - Exatidão de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de vítimas vivas	51
Gráfico 9 - Especificidade de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de cadáveres	52
Gráfico 10 - Sensibilidade de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de cadáveres	52
Gráfico 11 - Exatidão de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de cadáveres	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMEL – Amelogenina

APA - *acid phosphatase activity* ou atividade da fosfatase ácida

APS - persulfato de amônio

Art. – artigo

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CEDIM - Conselho Estadual de Direitos da Mulher

DEAM - Delegacia Especializada no Atendimento à Mulher

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfato

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou ensaio de imunoadsorção ligado a enzima

ES – Espírito Santo

FBI - Federal Bureau of Investigation

FN – Falso Negativo

FP – Falso positivo

IJSN – Instituto Jones dos Santos Neves

Kb – Kilo base

LoTE - tampão tris/EDTA pH 8

mA - miliampere

Mb – Mega base

min - minutos

mL - mililitros

mM – milimolar

mtDNA – DNA mitocondrial

nº - número

ng - nanogramas

ng/µL - nanogramas por microlitro

NGHM – Núcleo de Genética Humana e Molecular

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde
PAR – *Pseudo-Autosomic Region* ou Região Pseudo-Autosômica
pb – pares de bases
PC – Polícia Civil
PC9 - *Phenol Chloroform pH 9* ou Fenol Clorofórmio em pH 9
PCR - *polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial Hidrogeniônico
pM – picomolar
PNPM - Plano Nacional de Políticas para as Mulheres
PSA - *prostate-specific antigen* ou antígeno prostático específico
PVC - Policloreto de vinila
RM-STR - *Rapidly Mutating Short Tandem Repeats* ou Repetições Curtas em Tandem de mutação rápida
RM Y-STR – *Y Rapidly Mutating Short Tandem Repeats* ou Repetições Curtas em Tandem de mutação rápida do Y
RNA - ácido ribonucléico
rpm - rotações por minuto
RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
SC - *sperm cytology* ou citologia de espermatozóides
SDS - dodecil sulfato de sódio
seg - segundos
SRY - *Sex-Determining Region of the Y chromosome* ou Região de determinação sexual do cromossomo Y
STR – *Short Tandem Repeats* ou Repetições Curtas em Tandem
STS - *Sequence-Tagged Site* ou sequência de marcação de local
TE9 - tampão tris/EDTA pH 9
TBE - tampão tris/borato/EDTA
TEMED – *Tetramethylethylenediamine* ou Tetrametiletilenodiamina
TSPY - *Testis-specific Protein, Y-linked* ou proteína específica de testículo ligada ao Y
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
V – volts
Var - variados

VN - Verdadeiramente negativos

VP – Verdadeiramente positivos

Y-STR – Y *Short Tandem Repeats* ou Repetições Curtas em Tandem de Y

Xp - braço curto do cromossomo X

Yp – braço curto do cromossomo Y

Yq - braço longo do cromossomo Y

W - watts

°C - graus Celsius

μL - microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A VIOLÊNCIA SEXUAL CONTEXTUALIZADA	15
1.2 A GENÉTICA FORENSE	16
1.3 A DETERMINAÇÃO DE REGIÕES ESPECÍFICAS DO CROMOSSOMO Y	19
1.4 A RESPOSTA GENÉTICA: OS Y-STRs	23
1.5 ESTUDOS E ESTRATÉGIAS MOLECULARES DE DETECÇÃO.....	26
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 METODOLOGIA	33
3.1 AMOSTRAS	34
3.2 COMPOSIÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL	35
3.3 SIGILO E ASPECTOS ÉTICOS	35
3.4 EXTRAÇÃO DO DNA	36
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – POLYMERASE CHAIN REACTION)	37
3.6 IDENTIFICAÇÃO DE BANDAS E FOTODOCUMENTAÇÃO	38
3.7 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	39
3.8 DEFINIÇÃO DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E EXATIDÃO	40
4 RESULTADOS	42
4.1 COMPOSIÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL	43
4.2 TESTE GENÉTICO – UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE DNA MASCULINO.....	45
4.3 AMOSTRAS DE VÍTIMAS VIVAS	49
4.4 AMOSTRAS DE CADÁVERES	51
5 DISCUSSÃO	54
5.1 VIABILIDADE DOS MARCADORES	55
5.2 TESTE GENÉTICO – UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE DNA MASCULINO	56

5.3 AMOSTRAS DE VÍTIMAS VIVAS	58
5.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR DOS CADÁVERES VÍTIMADOS POR VIOLÊNCIA SEXUAL	59
5.5 ESPECIFICIDADE, SENSIBILIDADE E EXATIDÃO	60
5.5.1- AMOSTRAS DE VÍTIMAS VIVAS E DE CADÁVERES	62
6 CONCLUSÕES	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	74
I PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	75
II TABELA GERAL DE RESULTADOS DE AMPLIFICAÇÃO	78

1 Introdução

1.1 A VIOLÊNCIA SEXUAL CONTEXTUALIZADA

A violência sexual é representada sumariamente pelo crime de estupro. De acordo com o Art. 213 do Código Penal Brasileiro, estupro é constranger alguém, mediante violência ou grave ameaça, a ter conjunção carnal ou a praticar ou permitir que com ele se pratique outro ato libidinoso.

A agressão sexual ignora as barreiras culturais, classes sociais, níveis socioeconômicos e limitações pessoais. Esse tipo de crime pode ocorrer tanto em ambientes reservados quanto em lugares públicos, atingindo adultos e crianças, homens e mulheres, mas tendo como principais vítimas indivíduos do sexo feminino. Segundo dados do Conselho Estadual de Direitos da Mulher (CEDIM), a cada 12 segundos uma mulher é estuprada no Brasil.

Os casos de estupro, homicídio sexual e outras formas de abuso sexual têm sido reconhecidos como problema de saúde pública por entidades ligadas aos direitos humanos e órgãos internacionais, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS).

A OMS associa esses crimes com o desenvolvimento de diversos distúrbios, assim como problemas na saúde física, doenças sexualmente transmissíveis, gravidez indesejada, início do uso de drogas e álcool, desequilíbrios psíquicos, como tentativa de suicídio, além do trauma físico direto.

Em muitos casos, o crime sexual não resulta em uma penalização legal. Além da falta de denúncia formal, a impunidade se deve, muitas vezes, à ausência de evidências que ajudem a identificar e condenar os verdadeiros culpados. Neste sentido, os casos de violência sexual vêm sendo crescentemente visados pelas ciências forenses, com o objetivo de desenvolver estratégias mais eficientes de identificação e consequente penalização dos culpados.

De acordo com o Instituto de Pesquisa do Espírito Santo Jones dos Santos Neves (IJSN), os índices de violência contra a mulher aumentaram 9,1% nos últimos anos. Além disso, no que se refere à proporção anual de crimes letais por sexo, o masculino baixou de 90,8% (2010) para 89,9% (2011) do total de crimes letais, enquanto o feminino subiu de 8,6% para 10,1% de 2010 para 2011 (IJSN, 2012).

Ainda, dados da Delegacia Especializada no Atendimento à Mulher (DEAM – PC ES) demonstram que o maior número dos casos de violência contra a mulher é realizado por homens e na sua maioria por cônjuges (IJSN, 2006).

Dados do II Plano Nacional de Políticas para as Mulheres (II PNPM) mostram que entre 2000 e 2001, 27% das mulheres entrevistadas na Grande São Paulo e 34% na Zona da Mata Pernambucana relataram ter sofrido algum episódio de violência sexual cometido pelos parceiros ou ex-parceiros. Espantosamente, 71% das entrevistadas com mais de 15 anos disseram ter sido vítimas de violência sexual por parte de pessoas conhecidas.

Segundo Da Silva e colaboradores (2004), no ano de 2004 mais de 1000 casos de estupro foram registrados no Estado do Rio de Janeiro. Na maioria desses casos, a vítima não consegue identificar o agressor e, por falta de provas, não há prisão. A maioria dos casos não é denunciada por conta de aspectos morais, sociais e emocionais envolvendo a vítima e sua família. Estudos brasileiros apontam que somente 10% dos casos de estupro são reportados às autoridades policiais (Ministério da Saúde, 1998). Roewer (2009) reporta, ainda, que até o ano de 2009, mais de 180 mil amostras de suabes de vítimas de crimes sexuais ainda não haviam sido processadas nos EUA. No Brasil, pela falta de um banco de dados único, um número ainda maior de amostras está armazenado sem a perspectiva de serem avaliados.

Muito tem sido feito para reduzir os altos índices de agressão contra a mulher, como é o caso da criação da Lei nº 11340/2006, conhecida como Lei Maria da Penha, que visa coibir e prevenir a violência doméstica e familiar contra a mulher. O desenvolvimento de tecnologias mais modernas e eficientes para produção de provas concretas em casos de violência sexual, também visa aumentar o percentual de criminosos condenados e reduzir os índices de criminalidade.

1.2 A GENÉTICA FORENSE

Desde que Jeffreys e colaboradores, em 1985, utilizaram pela primeira vez o DNA como marcador molecular, através da técnica de DNA fingerprinting. Inicialmente

com os Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) e posteriormente com o uso de sequências repetitivas altamente variáveis, chamadas VNTR (Variable Number Tandem Repeats), permitiu-se diferenciar loci altamente similares entre parentes relacionados e essa ferramenta passou a ser empregada nas mais diferentes áreas da biologia. Até então, a evolução na área das análises forenses usando material genético apresentava um progresso lento. A transição do uso de marcadores sorológicos para marcadores baseados em ácidos nucléicos representou um grande avanço para as investigações criminais (NIJ, 2000).

Apenas um ano depois, a análise de marcadores moleculares foi aplicada em um caso criminal pela primeira vez, permitindo a identificação do estuprador e assassino de duas jovens no Reino Unido, (MORETI, 2009). A técnica passou a ser utilizada tanto na vertente cível, por meio dos testes de paternidade, quanto na criminal, usada na identificação de corpos em desastres em massa, covas coletivas remanescentes da segunda guerra mundial e até mesmo para solução de casos complicados em criminalística, destacando principalmente aqueles cujo material biológico é escasso (pequenos vestígios) e cujo material encontra-se altamente degradado e/ou com substâncias inibidoras de reação, como é o caso dos cadáveres em adiantado estado de putrefação.

Nos mais de vinte anos que separam o nascimento da genética forense e a atualidade, os testes de DNA evoluíram significativamente, de forma a se tornarem uma ferramenta sensível e eficaz no apoio à Justiça. O desenvolvimento da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), o Projeto Genoma Humano, a descoberta de novos marcadores e o desenvolvimento de novos equipamentos e tecnologias tornaram possível a automatização dos procedimentos e a obtenção de melhores resultados em menor tempo.

Após muitas divergências, a importância da evidência do DNA alcançou um consenso geral na atividade da justiça (WALSH, 2004), mas para ser aceito como evidência foi necessário que todas as etapas envolvidas no processo (coleta, protocolos a serem seguidos e interpretação dos resultados) fossem padronizadas e conduzidas de maneira correta ou, do contrário, seriam invalidadas numa investigação criminal (IWAMURA E MUÑOZ, 2003).

A identificação humana por DNA tornou-se uma importante ferramenta na resolução de casos envolvendo questões criminais e de paternidade (DOLINSKY E PEREIRA, 2007). O primeiro caso polêmico de identificação criminal feito a partir do DNA foi também em 1986, na Inglaterra, quando em um caso de homicídio, amostras coletadas de DNA do suspeito no local do crime foram comparadas com o DNA do acusado. Apesar de outros indícios apontarem para o acusado, o resultado da análise de DNA foi incompatível e o suspeito foi liberado. Assim, o FBI (Federal Bureau of Investigation) e vários outros centros de análises criminais, em muitos países, passaram a fazer correlações entre indivíduos e amostras biológicas encontradas nas cenas de crimes, utilizando marcadores de DNA.

No aspecto forense, a caracterização do material biológico tem por objetivo limitar ou reduzir o número de indivíduos que poderiam contribuir como fonte do material. A população sob suspeita algumas vezes é restrita, o que permite identificação mesmo com marcadores genéticos de baixo poder discriminatório. Contudo, nos casos em que a população não é restrita pelas circunstâncias do caso, os métodos de maior poder discriminatório tornam-se recursos importantes.

Sangue, saliva, pêlos, sêmen e outros vestígios biológicos, quando encontrados na cena do crime, passaram a ser provas fundamentais (BORÉM et al., 2001) e as sequências de DNA passaram a atuar como marcadores, identificando os suspeitos. O perfil de DNA passou então, a ser construído pela análise de algumas regiões polimórficas onde estes marcadores se encontram, e seu alto grau de diferenciação permitiu uma individualização do criminoso.

Por estas razões, o emprego do exame de DNA como ferramenta auxiliar na elucidação de crimes e na identificação de pessoas é tema de grande repercussão na sociedade. Entretanto, por ser excessivamente empregada nas ações de investigação de paternidade, a divulgação maciça da eficácia deste exame pelos meios de comunicação acabou por lhe dar uma aura de infalibilidade, colocando em descrédito os métodos analíticos mais antigos. Enfocada pela mídia como técnica suprema, foram omitidas do grande público as limitações existentes quando aplicada à Criminalística e à Medicina Forense (amostras degradadas, quantidade mínima de DNA necessária para realizar os exames, presença de inibidores de reação,

autorizações para o uso do DNA, etc.), bem como os custos e a complexidade dos processos técnicos exigidos para que sejam obtidos resultados confiáveis.

1.3 A DETERMINAÇÃO DE REGIÕES ESPECÍFICAS DO CROMOSSOMO Y

Os cromossomos humanos X e Y originaram-se a partir de um par de cromossomos autossomos proveniente dos répteis há 300 milhões de anos, muito antes do surgimento dos mamíferos (GRAVES e FOSTER, 1994).

Os cromossomos diferenciam-se entre si no tamanho e no conteúdo genético (figura 1). O tamanho do cromossomo X é de 165Mb e contém 1500 genes, muitos dos quais são *housekeeping* ou especializados na função de ambos os sexos, além de possuir 6 vezes mais eucromatina que o cromossomo Y. Em contraste, o Y é menor, 60Mb, e contém apenas 50 genes funcionais. A maioria deles é responsável pela determinação sexual e pela espermatogênese. Possui também uma variabilidade de blocos de heterocromatina (GRAVES, 2002).

O cromossomo Y de mamíferos possui uma parte crucial na determinação do sexo. Um embrião que herda o cromossomo Y desenvolve-se como um macho e um embrião sem esse cromossomo desenvolve-se como uma fêmea. Este fato ocorre devido à presença de genes determinantes do sexo no cromossomo Y e é de extrema importância no desenvolvimento das características masculinas (SINCLAIR et al., 1990).



Figura 1 - Cromossomo Humano X (maior) e Y (menor), aproximado 10.000 vezes (WILLARD, 2003)

Podendo ser dividido em três segmentos, o cromossomo Y tem propriedades

distintas. A primeira parte é composta por DNA em regiões pseudo-autossômicas com o cromossomo X. Essas regiões estão localizadas nos finais dos braços curto (Yp) e do longo (Yq) sendo denominadas regiões PAR 1 (região pseudo-autossômica 1) de 2.7Mb, e PAR 2 (região pseudo-autossômica 2) de 330Kb (ROSS et al., 2005). Devido à falta de um elemento homólogo, a maior parte do cromossomo Y não recombina durante a meiose, só se verificando recombinação – com partes homólogas do cromossomo X – apenas em PAR 1 e PAR 2. Essas regiões são responsáveis pelo pareamento entre os cromossomos X e Y, além da PAR 2 estar associada com as relações internas da epigenética (D'ESPOSITO et al., 1996; HEARD, 2005).

O segundo segmento do cromossomo Y é formado por sequências repetitivas de DNA satélite, presente em sua maior parte no braço longo (até 70%). Apesar de não codificarem proteínas, apresentam funções importantes no pareamento cromossômico e ampla utilização nas análises forenses.

A terceira parte é composta por genes específicos encontrados exclusivamente no cromossomo Y, localizados entre a região PAR 1 do Yp até o centrômero, e desde o centrômero até a heterocromatina no Yq, como mostrado na figura 2 (AVENT e CHITTY, 2006).

Dentre os diversos genes utilizados para os testes de determinação sexual, podemos destacar o SRY (Sex-Determining Region of the Y chromosome), o TSPY (Testis-specific Protein, Y-encoded), e o AMEL (amelogenina).

O gene SRY é definido como um marcador alvo para confirmar a presença de DNA masculino (AVENT e CHITTY, 2006; ANU BASHAMBOO, 2003). Este gene é evolutivamente conservado e requerido para determinação do sexo do indivíduo. Já foi verificado que indivíduos XX apresentam características masculinas na presença do SRY no genoma, ao mesmo tempo que indivíduos XY apresentam características femininas pela ocorrência de mutação ou deleção nesse gene (GRAVES, 2002).

SRY é capaz de interagir com outros genes tanto para facilitar como para interromper o processo de determinação sexual. Sua ação é iniciada com uma cascata de eventos, sendo regulada por muitos genes autossômicos ou genes

ligados ao X (SHAH e SMART, 1996). Mesmo sendo um gene de cópia única, esse gene é muito utilizado para determinação sexual por ser tratar de um Fator Determinante de Testículo, essencial na regulação do cromossomo Y (SHAH e SMART, 1996).

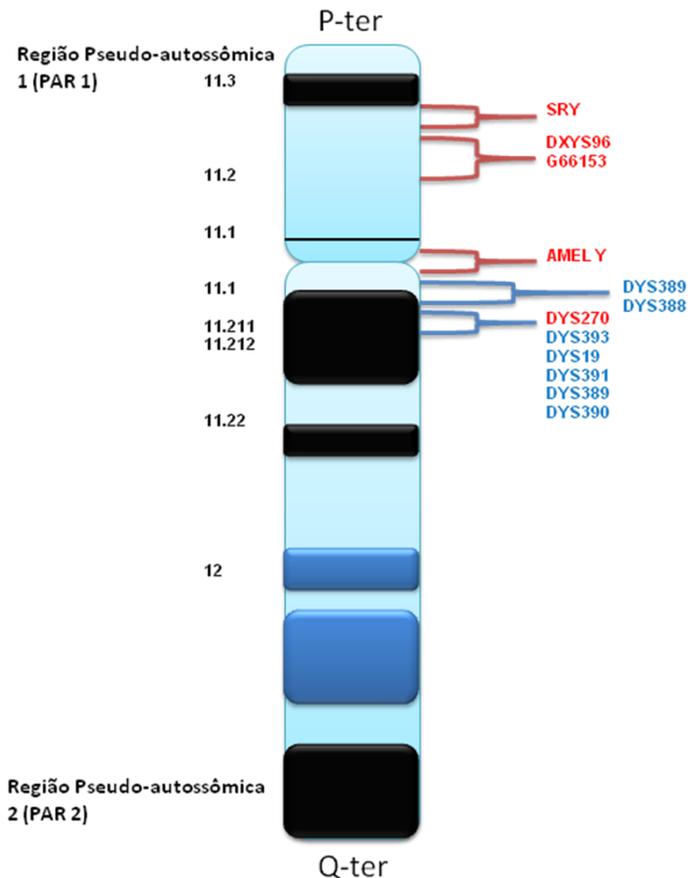


Figura 2 - Representação do cromossomo Y. Em vermelho, os genes e regiões envolvidos nesse estudo. Na cor azul, pequenas repetições em tandem (STRs) utilizados como marcadores na prática forense. As duas regiões pseudo-autossômicas estão localizadas perto do telômero, no braço q e p (adaptado de AVENT e CHITTY, 2006).

SRY é capaz de produzir uma proteína que, quando ligada em uma região gênica específica, é capaz de ativar a expressão do gene alvo. Isso faz com que mutações nos genes que regulam o *SRY* ou aqueles regulados por ele, possam conduzir a uma reversão sexual (HAQQ et al. 1994).

Já o gene da amelogenina (*AMEL*) está localizado nos cromossomos sexuais nas porções Xp22.1, Xp22.3 e Yp11.2 com uma diferença de seis pares de base no intron 1 entre o cromossomo X e o Y. Sequenciado por Nakahori e colaboradores

(1991), este gene é altamente aplicado nas investigações forenses para definir o sexo das vítimas em questão e está relacionado com a produção de uma proteína que compõe o esmalte do dente (ENSMINGER e HOFFMAN, 2002; DROBNIC, 2006).

Diversos estudos foram publicados sobre a confiabilidade da determinação sexual pela genotipagem de fragmentos específicos da amelogenina; problemas podem surgir não somente por detecção falsa (ou ausência de detecção) mas também em casos de quimerismo (transplante de medula óssea) ou microquimerismo (mulher grávida portando feto masculino) e por possíveis discrepâncias entre o sexo biológico (de interesse forense) e o sexo legal em documentos de identidade (VON WURMB-SCHWARK et al., 2007).

Nos casos de transplante de medula óssea, a medula doente do paciente é destruída e substituída pela medula saudável do doador. A nova medula óssea migra para as cavidades dos ossos longos, se implanta e começa a produção de células sanguíneas normais, dando resultados falsos para sexos diferentes quando essas amostras são genotipadas (VON WURMB-SCHWARK et al., 2007).

É sabido que DNA fetal é encontrado no plasma e soro materno em altas concentrações (BIANCHI, 2004). Em caso de gravidez de feto masculino, o DNA circulante também interferirá nas análises genéticas.

Tozzo e colaboradores (2013) mostraram em seu estudo que homens normais podem ser classificados como mulheres, pois a não produção de *amplicons* do gene da amelogenina (falso negativo) em testes moleculares pode ser decorrente de alterações na sequência do gene, principalmente por deleções.

Muitos estudos reportaram a ocorrência de *dropout* do alelo específico de Y da amelogenina, dado a uma deleção na região Yp11.2 envolvendo o *locus* da AMELY (JOBILING, 2007). Muitos autores sugerem que marcadores específicos de Y, como o do gene SRY, devem ser rotineiramente incluídos nas análises de DNA. A combinação do SRY com *primers* de identificação por STR (*Short Tandem Repeats*) comerciais não compromete a amplificação ou a genotipagem de STR autossômico.

A identificação errônea da definição sexual pode gerar muitos problemas em casos

clínicos e forenses (TOZZO et al., 2013). A fim de evitar problemas decorrentes da identificação errônea causada por *dropout* da AMELY, é recomendada a utilização do SRY como um marcador sexual adicional nos testes de DNA forenses (INTURRI et al., 2009).

DXYS96, DYS270 e G66153 representam marcadores de STS (*Sequence-Tagged Site*) exclusivamente do cromossomo Y. As STS são sequências relativamente pequenas, facilmente amplificáveis por PCR (200 a 500pb). Por se tratarem de cópias simples de DNA e devido à sua localização no mapa genômico já estar descrita, podem servir como marcadores específicos para determinadas porções cromossômicas (OLSON et al., 1989).

Quando os *loci* de STS contêm polimorfismos genéticos, tornam-se marcadores genéticos valiosos, podendo ser utilizados para diferenciar indivíduos. Os produtos de PCR provenientes de reações com STS demonstram padrões simples e altamente reproduzíveis em géis de agarose e poliacrilamida.

Explorando as singularidades presentes no cromossomo Y, é possível identificar o material genético masculino pela amplificação de sequências gênicas específicas em casos forenses onde a mistura de DNA masculino e feminino seja um problema.

1.4 A RESPOSTA GENÉTICA: OS Y-STRs

Mais de 99,7% do patrimônio genético da nossa espécie é igual em todos os indivíduos. A variação existente restante, cerca de 0,3% (aproximadamente 10 milhões de nucleotídeos), é suficiente para tornar cada um de nós um ser único, sendo esta “porção” de variação o objeto central das análises forenses (MARTINS, 2008).

A metodologia atualmente utilizada na maioria dos laboratórios para identificação genética (paternidade ou identificação forense) é a análise de sequência repetidas altamente polimórficas. Estas repetições são denominadas STR (*Short Tandem Repeats* ou Repetições Curtas em Tandem) e estão distribuídas ao longo do genoma, tanto nos cromossomos autossômicos como nos sexuais (X e Y).

A detecção das regiões STR para identificação ou eliminação de possíveis suspeitos trouxe um avanço para a Perícia Criminal no mundo. Sua disseminação mais que triplicou de 2001 a 2010; mais de 3500 publicações detalham a tecnologia e reportam as frequências alélicas para os *loci* de STR em centenas de populações pelo mundo (BUTLER, 2010).

Porém, esta técnica possui limitações no campo criminal, principalmente pelas características das amostras utilizadas. Em muitos casos, as amostras ficam expostas às condições ambientais, como calor, umidade, contaminação bacteriana, degradação enzimática, autólise, etc. Estes fatores fazem com que o material coletado apresente poucas células e, conseqüentemente, pouco DNA, que, em muitos casos, encontra-se degradado.

O desenvolvimento de sistemas de amplificação em *multiplex* tornou possível a genotipagem simultânea de um grande número de STR em uma única reação de PCR. Atualmente, a maioria dos laboratórios de genética forense recorre à utilização de kits comerciais, através dos quais se consegue proceder à amplificação simultânea de até 15 *loci* STR, o que proporciona um excelente poder de discriminação utilizando uma pequena quantidade de amostra.

A exclusividade masculina do cromossomo Y possibilita a utilização das sequências STR específicas presentes neste cromossomo como discriminadoras para a identificação de DNA masculino em amostras. Essa especificidade faz do cromossomo Y muito útil na genética forense, principalmente em casos de violência sexual (BARALDI, 2008).

O Y-STR oferece uma série de vantagens, dentre elas, a possibilidade de recuperar o perfil de um doador do sexo masculino em uma amostra que esteja misturada com DNA do sexo feminino (alta especificidade dos primers de Y); a possibilidade de identificar e diferenciar os múltiplos agressores em um crime de violência sexual; e a determinação do haplótipo de indivíduos do sexo masculino desaparecidos com a comparação com o Y-STR de seus parentes do sexo masculino (HANSON e BALLANTYNE, 2006).

A análise de sequência Y-STR permite não apenas detectar a presença de DNA

masculino (na presença de células), mas também definir toda uma linhagem patriarcal, já que todos os homens de uma mesma família compartilham o mesmo cromossomo Y. Nos casos de estupro, esta informação pode ser suficiente para excluir um suposto estuprador, mas sua inclusão no hall de suspeitos deve ser cautelosa. Representando a principal desvantagem da técnica, a identificação individual é prejudicada, pois parentes masculinos não podem ser excluídos como doadores da evidência, já que partilham o mesmo cromossomo Y (ROEWER, 2009) e que envolvimento de parentes nos crimes sexuais não tem uma ocorrência rara (KAYSER et al., 1997).

Apesar do poder de discriminação dos haplótipos Y-STR ser mais baixo do que os padrões de STR autossômicos, maiores taxas de sensibilidade e especificidade, além da possibilidade de identificação do agressor, vêm sendo descritas em trabalhos forenses que oferecem metodologias baseadas na detecção de DNA (RM-STR) ou RNA (RT-PCR semi-quantitativo, PCR em tempo real e *microarray*) (ROMERO-MONTOYA et al., 2011). Em muitas vezes, a amostra encontrada em uma cena de crime está em quantidade insuficiente ou em estado insatisfatório de conservação, o que a torna inviável para a análise dos marcadores autossômicos. Utiliza-se como alternativa para estes casos a investigação pelo DNA mitocondrial (mtDNA).

Além de novas tecnologias, é necessária a reunião destes marcadores em bancos de dados, possibilitando estimar suas frequências e permitindo o acesso em níveis confiáveis. Claramente, aplicar os benefícios da análise de DNA do cromossomo Y para detectar DNA masculino em misturas aprimorará as análises forenses, especialmente em casos de violência sexual, se for mantida a possibilidade de identificação em nível individual. Homens com parentesco próximo já estão sendo identificados singularmente através da utilização de marcadores de Y-STR com mutações rápidas (RM Y-STR), e essa técnica tem se mostrado bastante eficiente (BALLANTYNE et al., 2012).

Nos últimos 10 anos, uma série de estudos relacionados a misturas desiguais de DNA masculino/feminino foram publicados. É frequentemente observado em suabes vaginais coletados após agressão sexual que a porcentagem de DNA feminino representa quase a totalidade da amostra. Nesses casos o *dropout* alélico mascara

ou suprime os *amplicons* do componente em minoria (DNA masculino) em análises de STR, causado principalmente pela acumulação de produtos de PCR do componente mais abundante (RUANO et al., 1991).

Prinz e colaboradores (1997) mostraram em modelos experimentais que nessas misturas seria possível detectar DNA masculino até uma taxa de 1:4000 quando analisado por um Y-STR. Shewale e colaboradores (2003) analisaram amostras de sêmen azoospermático de indivíduos pós-vasectomizados para Y-STR e observaram uma grande variação na quantidade de DNA extraído, variação essa atribuída pelo autor como sendo proveniente de células epiteliais e/ou leucócitos.

Sibille e colaboradores (2002) reportaram resultados positivos em 33% dos casos de agressão sexual re-testados com Y-STR, nos quais os suabes foram inicialmente caracterizados como “negativos” para sêmen. Dekairelle e Hoste (2001) reportaram uma taxa de sucesso de 48% para haplótipos de Y-STR em amostras PSA positivas extraídas de suabes, e que não apresentavam resultados para o STR autossômico.

1.5 ESTUDOS E ESTRATÉGIAS MOLECULARES DE DETECÇÃO

[...] “quaisquer que sejam os passos, quaisquer objetos tocados por ele, o que quer que seja que ele deixe, mesmo que inconscientemente, servirá como uma testemunha silenciosa contra ele. Não apenas as suas pegadas ou dedadas, mas o seu cabelo, as fibras das suas calças, os vidros que ele porventura parta, a marca da ferramenta que ele deixe, a tinta que ele arranhe, o sangue ou sêmen que deixe. Tudo isto, e muito mais, carrega um testemunho contra ele. Esta prova não se esquece. É distinta da excitação do momento. Não é ausente como as testemunhas humanas são. Constituem, per se, numa evidência factual. A evidência física não pode estar errada, não pode cometer perjúrio por si própria, não se pode tornar ausente. Cabe aos humanos, procurá-la, estudá-la e compreendê-la, apenas os humanos podem diminuir o seu valor.” (COUTO, 2010 caput LOCARD, 1920)

Utilizando-se dessa premissa, a coleta e a análise das evidências podem gerar informação vital na identificação do agressor. Nos casos de violência sexual, o vestígio deixado pelo perpetrador é, na grande maioria das vezes, o contato físico com a vítima. A coleta de suabes orais, vaginais e anais deve ser tratada como

procedimento de rotina nos serviços médicos legais, embora em alguns estados do país ainda não seja prática, fato que dificulta as investigações e impede a resolução de muitos casos.

Instruídos por meios de comunicação, os criminosos estão cada vez mais cuidadosos em não deixar vestígios que os incriminem, principalmente com relação à deposição de esperma na vítima. Apesar disso, é possível que o esturador deixe rastros não espermáticos na vítima, como linfócitos, células epiteliais descamadas do pênis, do escroto, dos dedos, pelos pubianos com folículo, saliva, etc.

As técnicas bioquímicas mais recomendadas para as análises de rotina forense relacionadas ao estupro incluem citologia de espermatozoides (SC - *sperm cytology*), atividade de fosfatase ácida (APA - *acid phosphatase activity*) e a detecção por antígeno prostático-específico (PSA - *prostate-specific antigen*) (KHALDI et al., 2004). SC é o padrão ouro ou teste confirmatório; APA é um teste de triagem (presuntivo) (CHEN e HORTIN, 2000), enquanto a detecção por PSA representa a utilização de um marcador mais específico (STURGEON e ELLIS, 2007). Não se pode deixar de notar que esses marcadores têm mostrado estabilidades distintas quando testados em fluidos vaginais pós-coito (GRAVES et al., 1985) o que pode causar má interpretação dos resultados.

Um dos problemas históricos nos estudos de vestígios de violência sexual é a presença, quase que exclusivamente, de uma mistura de sêmen a outro líquido corporal e isso representa um problema sério para os exames sorológicos tradicionais de tipagem. Biomarcadores seminais já vêm sendo usados na detecção de sêmen em amostras vaginais em casos de violência sexual (SENSABAUGH, 1978; HERR et al., 1986), porém, em aproximadamente dois terços dos casos, não há possibilidade de se identificar o sêmen do doador pelo fato de a mistura dos fluidos biológicos resultar na mistura de tipos sorológicos.

O teste de PSA foi introduzido nas investigações criminais para estupro em 1971 (RAO et al., 2008). A detecção imunológica do antígeno é aceita como teste confirmatório em investigações de estupro, pois pode persistir em níveis detectáveis na vagina por até 48 horas pós-coito (GRAVES et al., 1985). Diversos kits comerciais já foram desenvolvidos e são rotineiramente utilizados no mundo.

Uma das técnicas mais utilizadas nos kits comerciais envolvendo o PSA é a realização de ensaio imunocromatográfico de um passo, pois além de simples, apresenta a precisão e especificidade próximas à técnica de ELISA (SATO et al., 2004), que é mais confiável, porém mais cara e trabalhosa. Apesar de considerados confiáveis, os testes com PSA demonstram resultados falso positivos em muitos estudos (DENISON et al., 2004; KAFAROWSKI et al. 2004), principalmente porque secreções corporais femininas, como o leite e o suor, contêm PSA em níveis muito mais baixos do limite de detecção, na maioria dos casos (LAFFAN et al., 2011).

Outra técnica muito comumente utilizada na atualidade para a confirmação de um possível estupro é a análise citológica para identificação de espermatozóide. Usualmente, suabes são retirados da cavidade vaginal da vítima e após eluição em solução tampão, são espalhados em lâminas para análise microscópica após coloração (ALLERY et al., 2001).

Muitas vezes a amostra de suabe vaginal proveniente do possível estupro pode conter pouco espermatozóide e/ou um grande número de outras células, incluindo fungos, ou restos celulares. Nesses casos, examinar as lâminas pode ser demorado, tornando a confirmação do crime sexual e a identificação do possível culpado muito difícil. Muitos desses métodos provaram-se eficazes para a identificação de espermatozóide mas requerem um alto nível de treinamento, caros equipamentos e uma longa fase de otimização dos protocolos (DE MOORS et al., 2013).

Nos casos em que a análise citológica de espermatozóide é positiva, testes genéticos são realizados para determinar o perfil do agressor e compará-lo com um suspeito ou com um banco de dados de DNA. Nesses casos, o DNA espermático pode ser separado do DNA não-espermático, o que permite a individualização da fonte do sêmen pelo método de extração diferencial de DNA por lise (GILL et al., 1985).

O método de extração diferencial de DNA por lise, amplamente utilizado para separar núcleos espermáticos das células vaginais em suabes, é utilizado como técnica padrão para separar misturas de material celular e espermatozóides (LABERKE et al., 2012). É extremamente importante para produção do perfil de DNA proveniente do sêmen. Porém, a técnica tende a falhar ou ser ineficiente nos casos

em que o esperma é velho ou degradado e quando o número de espermatozóides é baixo (ROEWER, 2009).

A preservação da célula espermática é influenciada pelo tempo entre a violência e a amostragem, o comportamento da vítima (ações autoprotetivas) e as condições sob as quais as amostras foram coletadas e armazenadas (SOARES-VIEIRA et al., 2007). Quando pouco ou nenhum espermatozóide está presente e/ou a proporção de DNA masculino/feminino é desfavorável, obtêm-se perfis de DNA incompletos ou de baixa qualidade do agressor masculino. No contexto forense, nota-se frequentemente que a porção masculina é a menor em mistura de perfis, mesmo na fração espermática (BENSCHOP et al., 2010). A dificuldade de detectar tanto células espermáticas quanto outros tipos celulares é frequente, entretanto isso não exclui a presença de DNA masculino.

Mesmo quando os espermatozóides são ausentes, vários tipos de células não espermáticas são deixados pelo perpetrador (epiteliais, leucócitos, células germinativas imaturas, etc.) e, apesar de não serem extraídas pelo método diferencial, ainda representam fonte viável de DNA para análise. Essas células são normalmente encontradas em uma concentração de 15% do material espermático (FEDDER, 1996), sendo a glândula e a vesícula seminal as maiores fontes de células.

A falta de espermatozóides nas amostras pode ser explicada, ainda, por uma possível azoospermia ou oligospermia do agressor, natural ou artificial (vasectomia).

A problemática atual é que para a realização dos testes genéticos, é essencial a presença de espermatozóides ou PSA, detectados por perito especialista. As amostras com ausência de espermatozóide do agressor ou com o PSA negativo são então armazenadas sem mais análise. Mesmo com a ausência de espermatozóides, é possível a presença de DNA do agressor, podendo fornecer evidência de contato sexual independente de ejaculação, contagem espermática, sucesso na extração diferencial ou proporção de DNA masculino/feminino na mistura.

Várias técnicas de análises moleculares são utilizadas atualmente para detecção de DNA exógeno masculino em misturas de DNA provenientes de casos de violência

sexual. Entre elas, são usadas a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e a eletroforese em gel de poliacrilamida.

A PCR é uma técnica quantitativa simples que permite a rápida amplificação de uma sequência de DNA de interesse, utilizando uma quantidade mínima de amostra. A técnica de PCR é uma amplificação realizada *in vitro* que gera milhões de cópias, utilizando pequenos fragmentos de DNA, os *primers*, que delimitarão as extremidades do fragmento a ser amplificado de DNA. Representa técnica com alta especificidade e aplicabilidade (BARALDI, 2008). É um dos mais importantes métodos dentro da genética molecular, sendo extremamente útil na análise forense, quando a quantidade de DNA extraído das amostras é muito pequena (DUARTE et al., 2001).

A eletroforese é uma técnica que possibilita separar moléculas em função da massa (tamanho), carga, forma e compactação, sendo uma técnica rápida, sensível e precisa. A molécula de DNA, por exemplo, migra em suportes como géis de agarose ou poliacrilamida pela ação de uma corrente elétrica com diferentes velocidades, dependendo do seu tamanho e forma. O gel de poliacrilamida é constituído por uma rede de polímeros que permite a migração de moléculas de diferentes massas moleculares. A desvantagem dessa técnica é a identificação dos fragmentos apenas quanto ao tamanho e não quanto à sequência (VIEIRA, 2010).

Os estudos moleculares são de extrema importância para as análises forenses, pois objetivam a identificação dos agressores e a produção de provas confiáveis. Com isso, auxiliam a polícia na identificação dos suspeitos e a realizar a justiça, dando base para julgamentos transparentes e ao estabelecimento da pena pelo delito cometido aos verdadeiros culpados.

2 Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar a presença de DNA masculino em amostras de suabe de vítimas de violência sexual no Estado do Espírito Santo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a amplificação do DNA presente nos suabes vaginais, orais e anais utilizando *primers* específicos do cromossomo Y;
- Avaliar a presença ou ausência da amplificação dessas regiões nas amostras estudadas;
- Comparar os resultados obtidos com testes de referência na detecção de espermatozoides e PSA;
- Determinar a taxa de acertos para determinação da viabilidade da técnica testada e validação da metodologia.
- Efetuar testes de especificidade, sensibilidade e exatidão;
- Comparar os resultados das amostras de vítimas vivas e de cadáveres.
- Identificar quais marcadores apresentaram os melhores resultados;

3 Metodologia

3.1 AMOSTRAS

A Polícia Civil do Espírito Santo é responsável pela produção e materialização das provas provenientes das ações criminosas. Nela, está contido o Departamento Médico Legal, cuja ação pericial é diretamente relacionada à violência contra a vida. Nesse âmbito, o Laboratório de Toxicologia é responsável por análises toxicológicas em material biológico bem como testes histológicos e imunológicos referentes à identificação de espermatozóides e PSA em amostras de vítimas de violência sexual.

Para este estudo, foram disponibilizadas 132 amostras de suabe de vítimas de violência sexual do sexo feminino, coletadas entre os meses de março de 2012 e fevereiro de 2013.

A coleta do suabe foi realizada por um médico Legista da Polícia Civil do Espírito Santo, dentro da sua rotina de trabalho. Depois de encaminhada para análise no Laboratório de Toxicologia, a amostra foi fracionada e disponibilizada à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) para estudo. As amostras disponibilizadas representavam, no máximo, 20% do volume total da amostra. Foram mantidas congeladas até o transporte e processamento. Por se tratar de material em processo de descarte, sua utilização no presente estudo não trouxe prejuízo às avaliações criminais nem à viabilidade da contra prova armazenada no Laboratório de Toxicologia da Polícia Civil do Espírito Santo.

Por serem originadas de esfregaço vaginal e anal, de vítimas violentadas e de cadáveres, a qualidade das amostras foi a todo tempo questionada, tendo em vista que na maioria desses casos, a preservação do DNA como prova não é ou não pode se sobrepor as necessidades emocionais da vítima ou as condições climáticas.

As amostras de suabe disponibilizadas pela Polícia Civil foram transportadas até a UFES em 80 – 100µL de solução tampão e foram armazenadas em congelador até que fossem submetidas à extração de DNA.

As amostras utilizadas como controle no estudo foram provenientes de esfregaço da mucosa oral de três voluntários do sexo masculino e três do sexo feminino, sem grau de parentesco entre si. A coleta de amostras dos controles e todo processo de

extração e avaliação de DNA do estudo foram realizadas no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) da Universidade.

3.2 COMPOSIÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL

O grupo amostral foi composto por 132 amostras do sexo feminino, das quais 25 eram de esfregaço anal, cinco de esfregaço oral e 102 amostras de esfregaço vaginal. Vinte e três amostras foram provenientes de cadáveres e 109 de vítimas vivas de violência sexual (Gráfico 1).

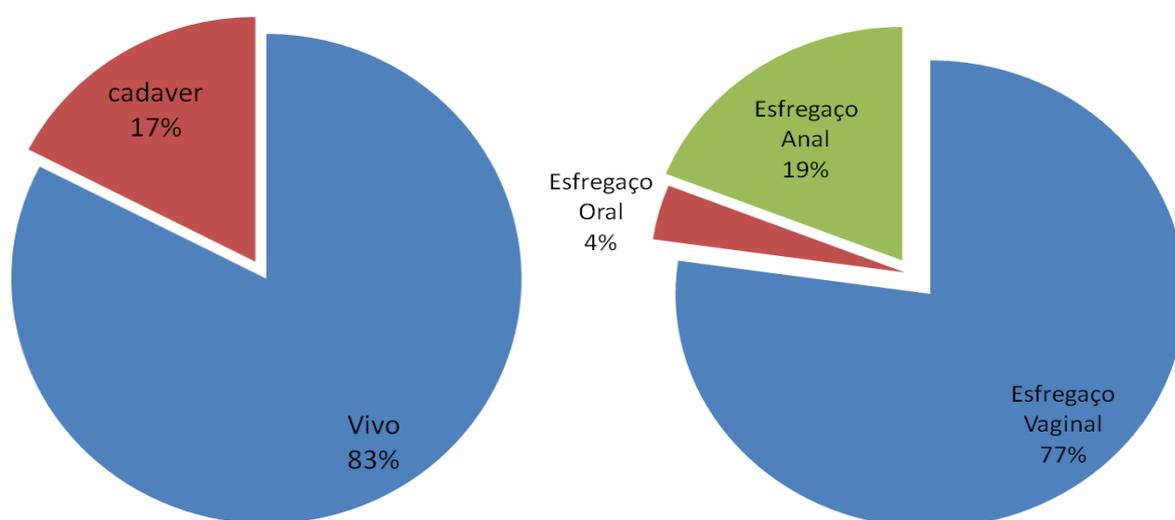


Gráfico 1 – Composição do grupo amostral

3.3 SIGILO E ASPECTOS ÉTICOS

Nenhum dado referente às vítimas ou sobre o seu caso foi coletado nem avaliado neste estudo, cabendo à Polícia Civil do Espírito Santo a detenção de todas as informações. Trata-se de um estudo retrospectivo, em que foram avaliadas alíquotas de amostras de interesse no banco de evidências do Laboratório de Toxicologia. As amostras em questão já haviam passado por processo de perícia não sendo mais essenciais às investigações. As amostras foram identificadas numericamente tão somente para controle no estudo, sem qualquer correlação com dados pessoais provenientes da Polícia Civil.

Todos os dados e materiais biológicos coletados estão sob responsabilidade do pesquisador responsável, Prof. Dr. Iuri Drumond Louro.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santos (CAAE: 13592513.8.0000.5060, parecer nº 237.293).

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

Cada amostra teve seu DNA extraído organicamente através de digestão com Proteinase K e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), seguida de extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol (SAMBROOK, 1989). A extração detalhada está descrita abaixo:

- a) Transferiu-se 100µl de solução tampão para um tubo de 1,5ml de polipropileno e adicionou-se 280µl de TE9 (Tris-EDTA pH 9), seguido de homogeneização.
- b) Adicionou-se 20µl de SDS proteinase K (5mg/ml em 10% SDS/Dodecil Sulfato de Sódio).
- c) Incubou-se em banho-maria a 58°C por 2 horas. Nesse período, as células foram lisadas pelo SDS e as proteínas digeridas pela proteinase K.
- d) Após o banho, adicionou-se 400µl de PC9 (Phenol Chloroform pH9), homogeneizando por 1 minuto.
- e) Centrifugou-se a 14.000 rpm por 2 minutos a 4°C
- f) Transferiu-se o sobrenadante aquoso para um novo tubo, evitando tocar na interfase, que contém proteínas desnaturadas (a captura do fenol é prejudicial a reações futuras).
- g) Adicionou-se novamente PC9 e repetiu-se os passos (e) e (f).
- h) Em um volume prévio aproximado de 380µl, adicionou-se 100µl de NH₄OH 10M.
- i) Para a etapa de precipitação do DNA, adicionou-se 1000µl de etanol gelado ao tubo.
- j) Centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos.

- k) Descartou-se o sobrenadante, lavou-se com etanol 70% e secou-se à temperatura ambiente.
- l) Ressuspendeu-se o DNA em 30µl de LoTE e manteve-se em banho-maria a 37°C por 15 minutos.
- m) Armazenou-se em geladeira a 4°C

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR - *Polymerase Chain Reaction*)

As regiões do cromossomo Y analisadas neste estudo foram amplificadas por PCR em um termociclador Mastercycler® personal da marca Eppendorf, utilizando-se *primers* descritos por Fuqua et al., 1997 e *primers* descritos e modificados por Carvalho et al., 2007 (tabela 1).

Após a obtenção dos *primers*, a reação de PCR foi padronizada, testando-se os seguintes parâmetros: concentração de primers, temperaturas de anelamento, número de ciclos e condições para a extensão final (temperatura e duração).

As reações foram padronizadas de forma que todas as amostras foram testadas juntamente com dois controles de amplificação e dois controles de contaminação. Os controles de amplificação representavam respectivamente DNA masculino (amplificação obrigatória) e DNA feminino (não amplificação obrigatória) em diluições de 1:100. Os controles de contaminação representavam água ultrapura pipetada concomitantemente com as amostras de teste divididas em: (1) pipetagem em fluxo laminar (para controle em pré-PCR) e (2) pipetagem em bancada (para controle em DNA). Nos dois casos, a não amplificação era obrigatória.

A eficácia dos *primers* foi testada em amostras controles cujo DNA masculino fora diluído em água em diferentes concentrações. Tal teste se fez necessário a fim de identificar quais marcadores eram capazes de amplificar a região de interesse em uma baixa concentração de DNA molde, simulando a concentração do DNA exógeno masculino em relação ao DNA da vítima de agressão sexual.

Tabela 1 – *Primers* utilizados na amplificação dos fragmentos

PRIME R	REGIÃO	P B	SEQUENCIA
G66153	STS de Y	8 2	F – 5' - CAGGGGGAGAAACAGACAAA - 3' R – 5' - GGGTGAGCCTGTTGATACCT - 3'
DXYS9 6	STS de Y	3 12	F – 5' - CACATTACTGGTGGGAGGAG - 3' R – 5' - CATCATCGCCCTACACTACC - 3'
SRY D&E	SRY	1 95	F – 5' - GGTAAGTGGCCTAGCTGGTG - 3' R – 5' - GCACAGAGAGAAATACCCGAA - 3'
SRY F&G	SRY	2 12	F – 5' - GTAACAAAGAATCTGGTAGA - 3' R – 5' - TTTCAGTGCAAAGGAAGGAA - 3'
DYS270	STS de Y	2 16	F – 5' - TTCCATTTGATGTATTCCCG - 3' R – 5' - GATTGGACTGGAATGGAATG - 3'
AMEL - Y	AMELOGE NINA	1 00	F- 5' – CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG - 3' R- 5' – ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG - 3'

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE BANDAS E FOTODOCUMENTAÇÃO

Após cada reação de amplificação, os produtos foram aplicados em gel de poliacrilamida 7% [8,75 mL de acrilamida 40%, 5mL de TBE 10X, 325µL de persulfato de amônio (APS) 10%, 35µL de TEMED e água destilada para o volume final de 50mL] para verificar o resultado da PCR. Cerca de 6µL de produto de PCR de cada amostra foram misturados com 2µL de corante e aplicados no gel juntamente com um marcador de peso molecular (50pb).

A corrida dos fragmentos deu-se a 240V, variando-se o tempo de acordo com o tamanho do fragmento (60 a 90 minutos) - quanto maior o fragmento, maior o tempo de corrida (tabela 2). O gel foi corado com nitrato de prata, de acordo com a metodologia descrita por Sanguinetti e colaboradores (1994):

- Colocou-se o gel, por 3 minutos, em solução fixadora de ácido acético glacial 0,5% e etanol 10% em volume suficiente para cobrir o gel;
- Descartou-se a solução e repetiu-se o procedimento;
- Descartou-se novamente a solução;

- d) Colocou-se o gel, por 15 minutos, em solução de nitrato de prata 0,1%, tomando o cuidado de impedir o contato da solução com a luz, por ser fotossensível;
- e) Lavou-se rapidamente o gel em água (cerca de 10 segundos) para retirar o excesso de solução de nitrato de prata;
- f) Colocou-se o gel em solução reveladora de formaldeído 0,1% e hidróxido de sódio 1,5%, até que sejam visualizadas as bandas;
- g) Descartou-se a solução;
- h) Digitalizou-se imagem em fotodocumentador;
- i) Secou-se o gel sobre papel para armazenagem ou envolvê-lo em filme de PVC transparente.

As reações de amplificação foram consideradas padronizadas quando se verificou, em gel, a presença da banda de interesse (tamanho esperado) nos controles masculinos, e a ausência da amplificação nos controles femininos, quando comparadas a um marcador de peso molecular.

Tabela 2 – Tempo de corrida em gel.

FRAGMENTO (Marcador)	FRAGMENTO (pb)	GEL DE POLIACRILAMIDA 7%
STRY D&E	195	80 minutos
STRY F&G	212	80 minutos
AMEL Y	100	60 minutos
DXYS96	312	120 minutos
DYS270	216	80 minutos

3.7 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os fragmentos amplificados foram analisados por inclusão, ou seja, a amplificação de regiões específicas do cromossomo Y caracteriza a presença de DNA do sexo masculino, e a não amplificação (o não aparecimento de banda) caracteriza a ausência de DNA exógeno masculino. Na avaliação da PCR, os marcadores utilizados no estudo apresentaram tamanhos de fragmentos variados de acordo com a tabela 1.

A análise molecular não pode ser realizada por mais de uma vez devido à pequena quantidade de material genético disponibilizada para os testes.

A presença de DNA masculino foi comparada com os resultados da análise citológica de espermatozóide e imunológica de PSA, realizadas em procedimento de rotina pela própria Polícia Civil do Espírito Santo, para que fosse analisada a eficiência dos testes.

Na avaliação individual dos resultados, a presença das bandas de interesse na amostra indicava a presença de DNA exógeno masculino, já na avaliação conjunta dos resultados, escores positivos foram considerados quando três ou mais marcadores apresentaram amplificação do fragmento de interesse.

3.8 DEFINIÇÃO DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E EXATIDÃO

Testes para medir a sensibilidade, especificidade e exatidão foram aplicados a fim validar a metodologia utilizada. A sensibilidade mensura a porcentagem de verdadeiros positivos em relação à classe observada positiva, medindo a capacidade de identificar corretamente a variável em estudo, ou seja, ela representa a proporção de amostras verdadeiramente positivas entre as amostras controle (FLEISS, 1981). Em outras palavras, a sensibilidade mede qual a frequência do teste estar correto entre as amostras consideradas positivas, classificando corretamente como positivas verdadeiras. É calculada através da equação - $[VP/(VP+FN)]$.

Já a especificidade mensura a porcentagem de verdadeiros negativos em relação à classe observada negativa, medindo a capacidade do teste em excluir corretamente as análises falsamente marcadas como positivas (FLEISS, 1981), medindo a frequência do teste estar correto ao dizer quais amostras negativas são realmente consideradas negativas. É calculada através da equação - $[VN/(VN+FP)]$.

De acordo com Menezes (2012), os termos sensibilidade e especificidade relacionam-se inversamente: quanto maior a primeira, menor a segunda e vice-versa. A preferência por mais sensibilidade ou mais especificidade depende da

função do instrumento; se esta for a seleção de casos homogêneos para um ensaio clínico, por exemplo, pode-se desejar maior especificidade; se o objetivo for a detecção precoce de uma patologia na população, o instrumento deve ser mais sensível.

A exatidão de um teste representa o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro, indicando sua proximidade aos valores reais de análise previamente definidos. É calculado como a proporção de resultados verdadeiramente positivos e negativos numa população em estudo $[(VP+VN)/TOTAL]$ e reflete a precisão do teste na identificação de DNA nas amostras, comparadas ao padrão ouro.

A chave para cálculo de especificidade, sensibilidade e exatidão encontra-se representada na tabela 3.

Tabela 3 - Chave para cálculo de especificidade, sensibilidade e exatidão.

Resultado	Critério padrão (Verdade)	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
Negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadeiro Negativo (VN)

4 *Resultados*

4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA POR PCR

As condições ideais de amplificação, específicas para cada fragmento analisado, estão descritas nas tabelas 4 e 5.

As reações de amplificação foram consideradas padronizadas quando se verificou, em gel, a presença da banda de interesse nos controles masculinos, e a ausência da amplificação nos controles femininos (Figura 3).

Tabela 4 – Concentrações ideais de reagentes para as reações de amplificação.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL
10X PCR Buffer	1X
MgCl ₂ 50mM	1,5mM
dNTP 10mM	0,2mM
Primer <i>Forward</i> 25µM	1µM
Primer <i>Reverse</i> 25µM	1µM
<i>Taq</i> DNA Polimerase 5U/µL	1U
DNA	(5uL de DNA / 15uL de reação)*

*Concentração não quantificada.

Tabela 5 – Condições ideais de temperatura/tempo para as reações de amplificação

	ETAPAS DA PCR				
	DESNATURAÇÃO INICIAL	DESNATURAÇÃO	ANELAMENTO	EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL
TEMPERATURA/	94°C	94°C	X°C	72°C	72°C
TEMPO	10 min.	30 seg.	30 seg.	60 seg.	10 min.
CICLOS	1		35		1

A temperatura de anelamento foi específica para cada marcador, sendo 53°C para AMEL Y; 57°C para SRY F&G e DYS270; e 64°C para SRY D&E e DXYS96.

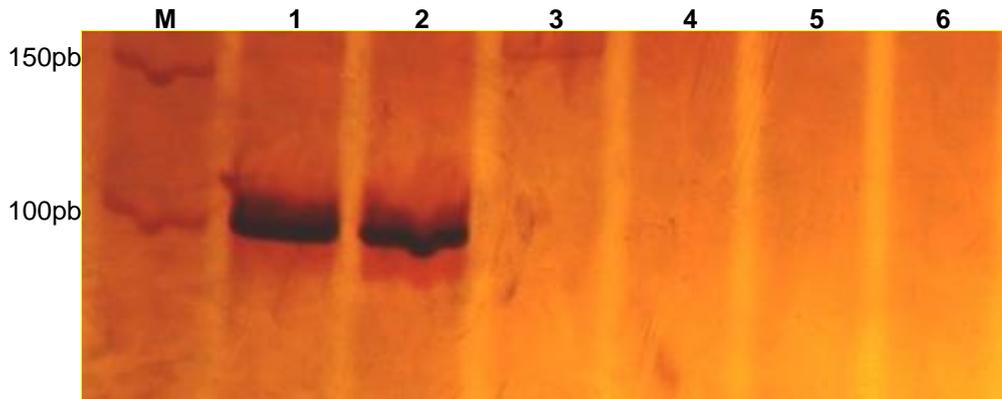


Figura 3 – Gel de poliacrilamida 7% da PCR do marcador AMEL Y. Amostras: (M) Marcador de peso molecular (Life Technologies; 50pb); (1) DNA masculino 1:10; (2) DNA masculino 1:100; (3) DNA feminino 1:10; (4) DNA feminino 1:100; (5) controle negativo de pré-PCR; (6) controle negativo de pipetagem de DNA.

O marcador G66153 não apresentou amplificação satisfatória, pois gerou fragmentos de interesse em todos os controles femininos nas diversas condições testadas (figura 4). Assim, optou-se pela não utilização do G66153 no estudo.

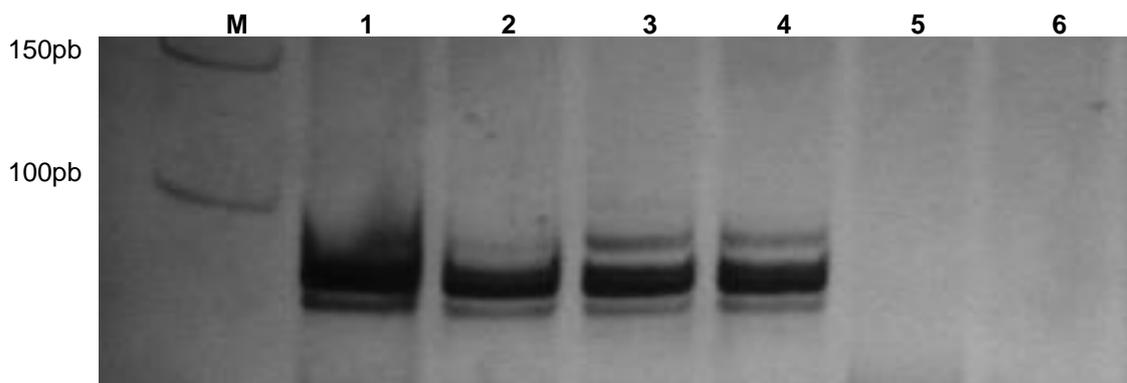


Figura 4 – Gel de poliacrilamida 7% da PCR do marcador G66153. Amostras: (M) Marcador de peso molecular (Life Technologies; 50pb); (1) DNA masculino 1:10; (2) DNA masculino 1:100; (3) DNA feminino 1:10; (4) DNA feminino 1:100; (5) controle negativo de pré-PCR; (6) controle negativo de pipetagem de DNA.

Demais marcadores mostraram boa amplificação, como mostrado nas figuras 5 e 6.

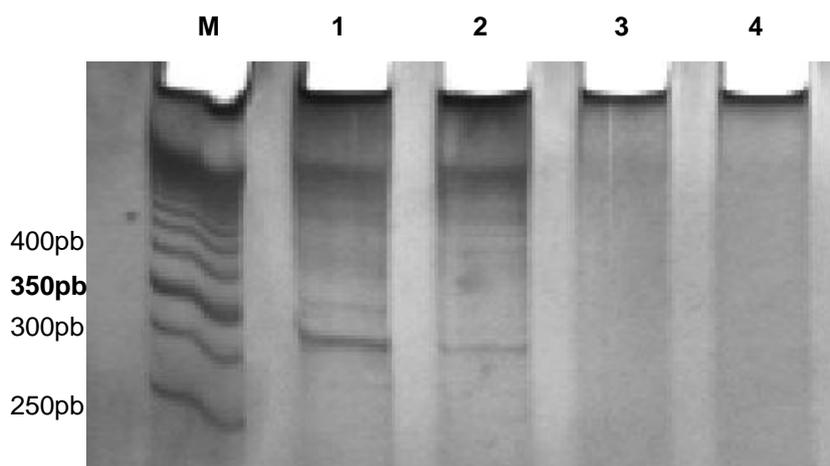


Figura 5 – Gel de poliacrilamida 7% da PCR do marcador DXYS96. Amostras: (M) Marcador de peso molecular (Life Technologies; 50pb); (1) DNA masculino 1:10; (2) DNA masculino 1:100; (3) DNA feminino 1:10; (4) DNA feminino 1:100.

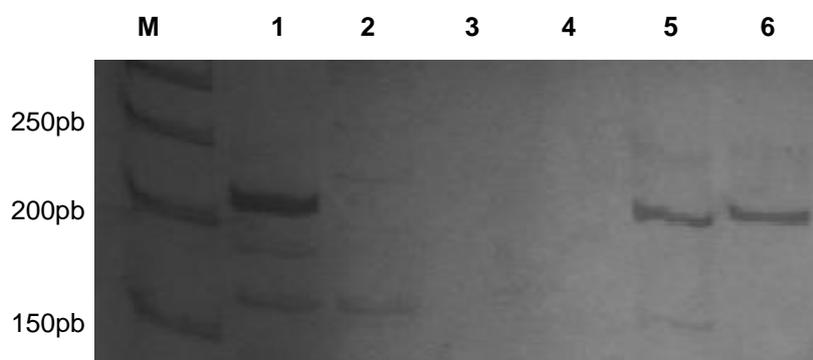


Figura 6 – Gel de poliacrilamida 7% da PCR do marcador SRY F&G. Amostras: (M) Marcador de peso molecular (Life Technologies; 50pb); (1) DNA masculino 1:100; (2) DNA feminino 1:100; (3) controle negativo de pré-PCR; (4) controle negativo de pipetagem de DNA; (5) amostra n° 124; (6) amostra n° 125.

4.2 TESTE GENÉTICO – UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE DNA MASCULINO

Neste teste, resultados foram considerados ‘positivos’ quando uma mesma amostra apresentou amplificação da banda de interesse em pelo menos três dos cinco marcadores analisados.

Comparando-se os resultados fornecidos pela PC-ES com os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que:

- a) A análise citológica de espermatozoides revelou 17 amostras positivas, das quais foi possível detectar 14 com o teste genético realizado neste trabalho. Dentre as 115 amostras negativas para a análise de espermatozoides, 29 se mostraram positivas com o teste genético.

- b) Com relação ao teste de PSA, de 43 amostras positivas, 24 apresentaram o mesmo resultado no teste genético. No entanto, dentre as 89 amostras negativas para PSA, verificou-se que 19 apresentaram resultado positivo para o teste genético.

Nas 132 amostras testadas, o percentual de acerto foi de 75,4% quando comparado com as análises citológicas de espermatozóide e de 71,2% na avaliação imunológica de PSA.

Os valores de sensibilidade, especificidade e exatidão são mostrados no gráfico 2. SC (*Sperm Citology*) representa os valores referentes à análise citológica de espermatozóide e dados de PSA são valores comparados com a avaliação imunológica de antígeno prostático específico.

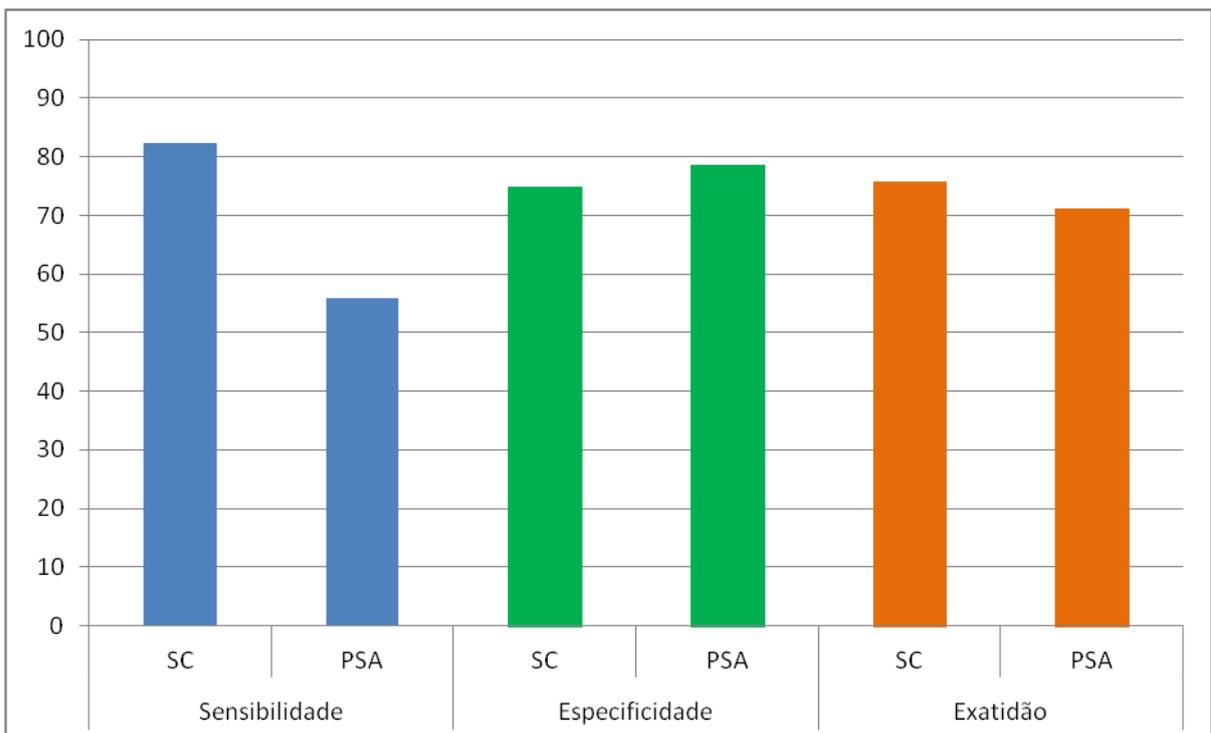


Gráfico 2 - Valores de sensibilidade, especificidade e exatidão para as 132 amostras

Quando analisados separadamente, os marcadores moleculares apresentaram as seguintes taxas de acertos: 86,4% para AMEL Y, 74,3% para SRY D&E, 35,6% para SRY F&G, 53,8% para DXYS96 e 83,3% para DYS270 quando comparadas com os resultados da análise citológica de espermatozóide. As taxas de acertos quando

comparadas a avaliação imunológica de PSA foram: 72,7% para AMEL Y, 67,9% para SRY D&E, 40,1% para SRY F&G , 56,8% para DXYS96 e 68,2% para DYS270.

Os valores de especificidade, sensibilidade e exatidão foram calculados e apresentaram os valores abaixo:

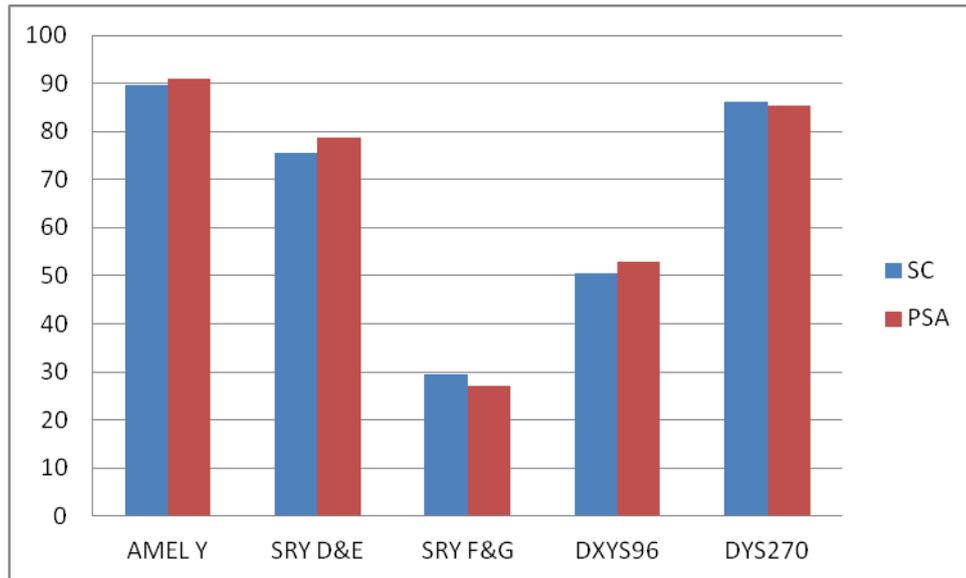


Gráfico 3 - Especificidade de cada marcador em comparação com SC e PSA.

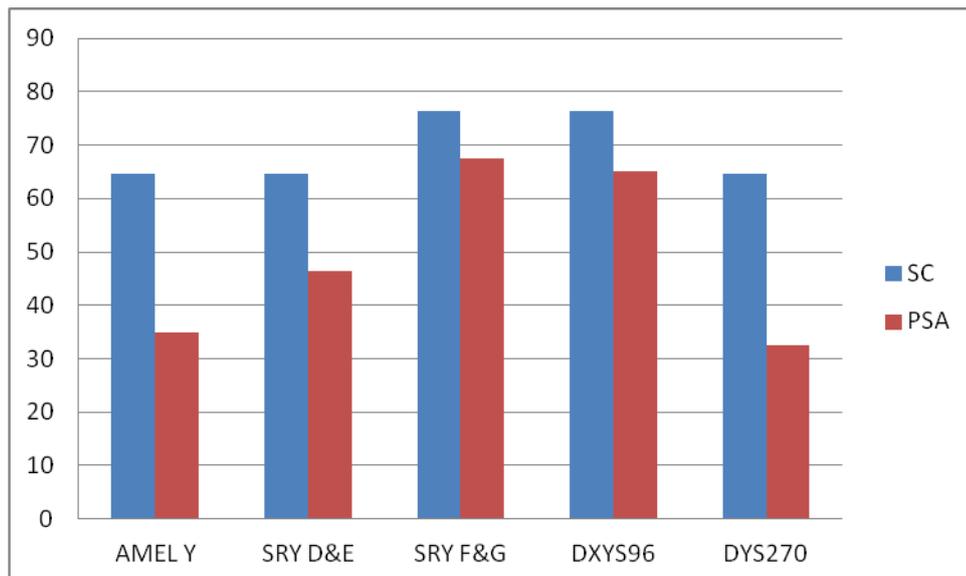


Gráfico 4 – Sensibilidade de cada marcador em comparação com SC e PSA.

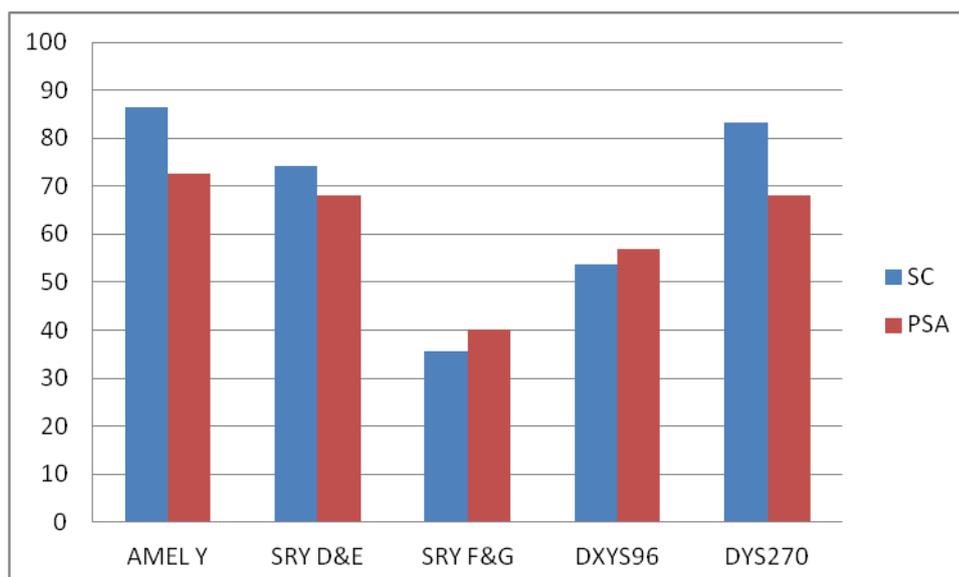


Gráfico 5 – Exatidão de cada marcador em comparação com SC e PSA.

Dezenove amostras apresentaram amplificação em pelo menos três marcadores e apresentaram resultados negativos tanto nas análises citológicas de espermatozóide quanto na avaliação imunológica de PSA. Dessas, quatro amostras amplificaram todos os marcadores, três tiveram amplificação em quatro marcadores e 12 amplificaram três dos cinco marcadores estudados (Tabela 6).

Tabela 6 – Amplificação dos marcadores nas amostras negativas para SC e PSA.

Amostra	Amel Y	SRY D&E	SRY F&G	DXYS96	DYS270
5	-	-	+	+	+
8	-	-	+	+	+
31	-	-	+	+	+
39	-	+	+	+	-
52	-	-	+	+	+
70	+	+	+	+	-
74	-	+	+	+	-
76	-	+	+	+	-
77	-	+	+	+	+
84	+	+	+	+	+
85	-	-	+	+	+

Tabela 6 – Amplificação dos marcadores nas amostras sugeridas para genotipagem (cont.).

Amostra	Amel Y	SRY D&E	SRY F&G	DXYS96	DYS270
100	+	+	+	+	-
104	-	+	+	+	-
121	-	+	+	+	-
123	-	+	+	+	-
129	-	-	+	+	+
131	+	+	+	+	+
133	+	+	+	+	+
139	+	+	+	+	+

4.3 AMOSTRAS DE VÍTIMAS VIVAS

As 109 amostras provenientes de vítimas vivas foram avaliadas para a amplificação da banda de interesse e o teste genético apresentou as seguintes taxas de acertos: 86,3%(94/109) para AMEL Y, 71,6%(78/109) para SRY D&E, 34,9%(38/109) para SRY F&G , 50,5%(55/109) para DXYS96 e 82,6%(90/109) para DYS270 quando comparadas com os resultados da análise citológica de espermatozóide. As taxas de acertos quando comparadas a avaliação imunológica de PSA foram: 71,6%(78/109) para AMEL Y, 67,9%(74/109) para SRY D&E, 38,5%(42/109) para SRY F&G , 54,1%(59/109) para DXYS96 e 67,9%(74/109) para DYS270.

Os gráficos 6, 7 e 8 mostram os valores de especificidade, sensibilidade e exatidão calculados para os resultados de amplificação em cada marcador molecular.

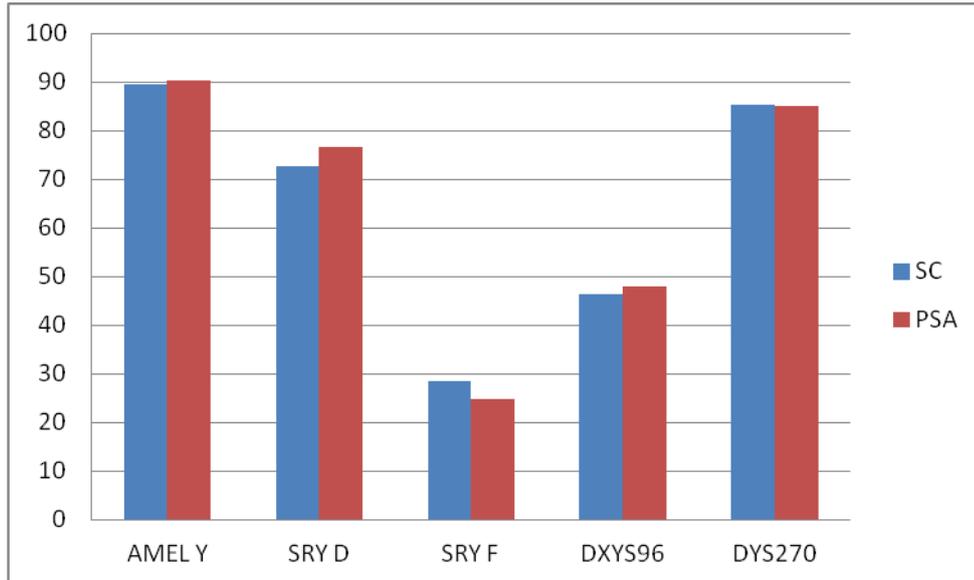


Gráfico 6 – Especificidade de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de vítimas vivas.

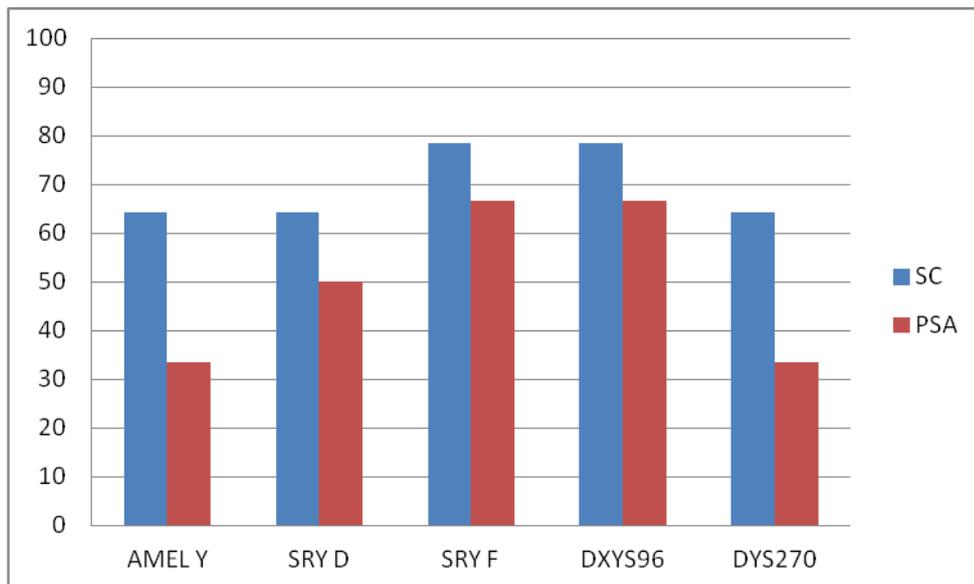


Gráfico 7 – Sensibilidade de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de vítimas vivas.

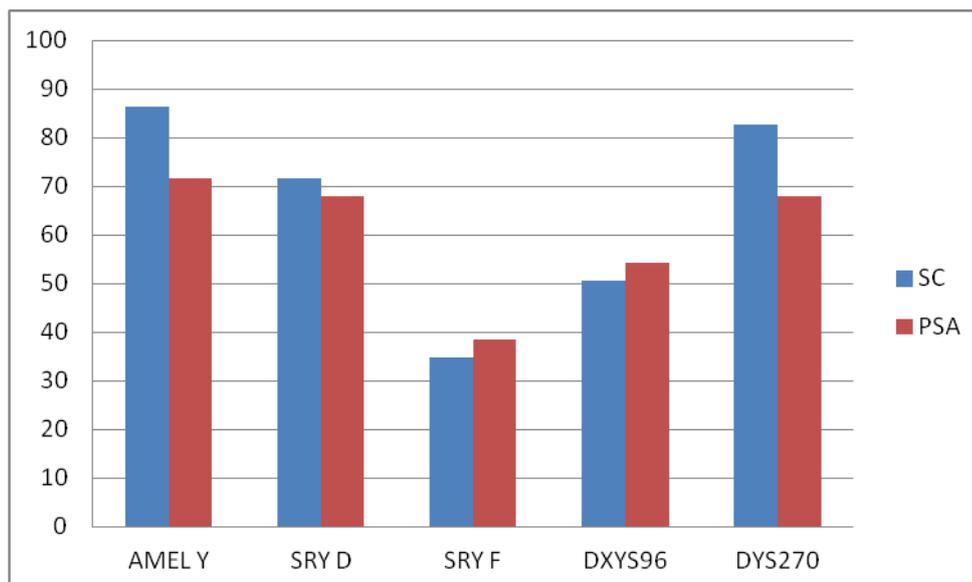


Gráfico 8 – Exatidão de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de vítimas vivas.

4.4 AMOSTRAS DE CADÁVERES

A avaliação genética das 23 amostras provenientes de cadáveres apresentou as seguintes taxas de acertos: 87%(20/23) para AMEL Y, 87%(20/23) para SRY D&E, 39%(9/23) para SRY F&G, 69,5%(16/23) para DXYS96 e 87%(20/23) para DYS270 quando comparadas com os resultados da análise citológica de espermatozóide. As taxas de acertos quando comparadas a avaliação imunológica de PSA foram: 78,2%(18/23) para AMEL Y, 69,5%(16/23) para SRY D&E, 47,8%(11/23) para SRY F&G, 69,5%(16/23) para DXYS96 e 69,5%(16/23) para DYS270.

Os gráficos 9, 10 e 11 mostram os valores de especificidade, sensibilidade e exatidão calculados para os resultados de amplificação em cada marcador molecular.

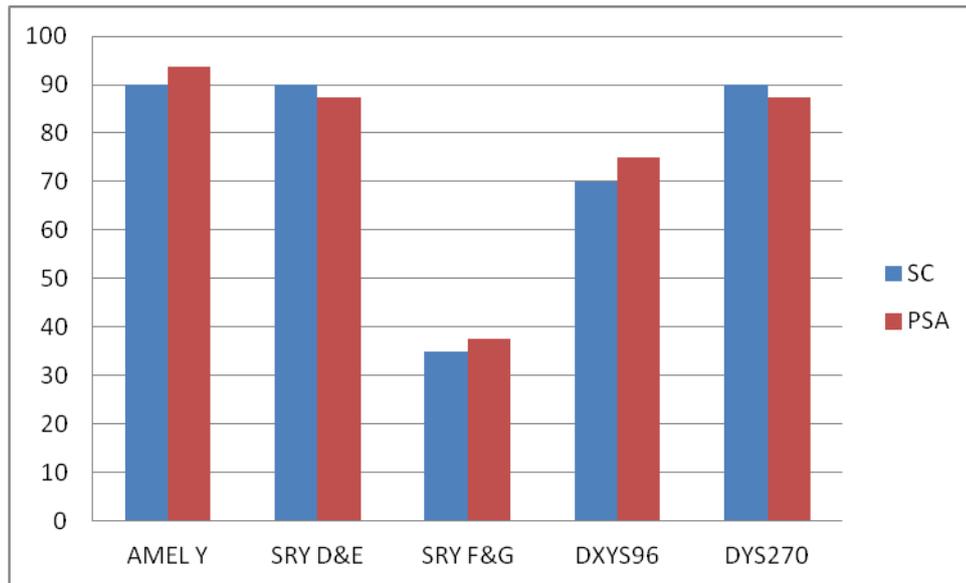


Gráfico 9 – Especificidade de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de cadáveres.

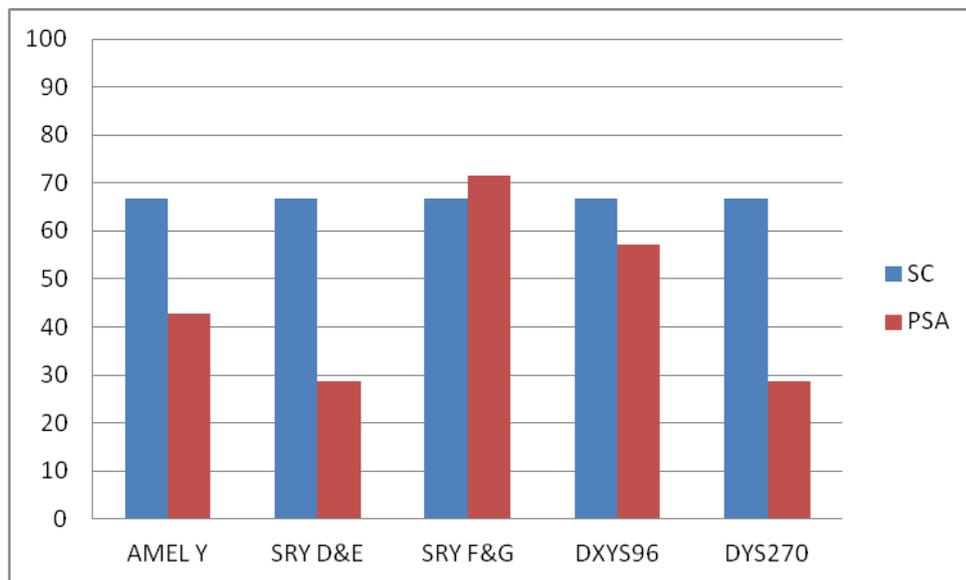


Gráfico 10 – Sensibilidade de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de cadáveres.

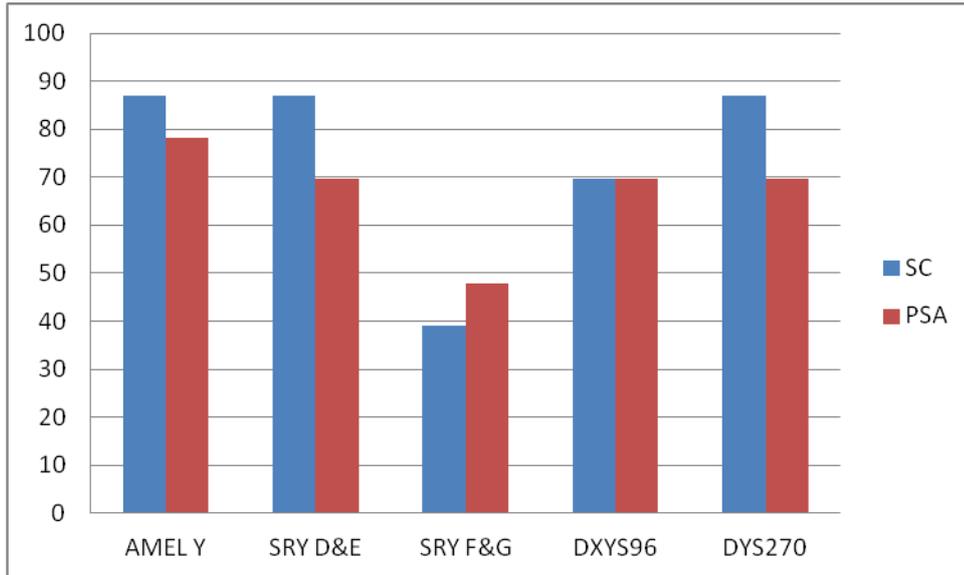


Gráfico 11 - Exatidão de cada marcador em comparação com SC e PSA em amostras de cadáveres.

5 Discussão

A análise do DNA pode ser considerada um dos principais progressos técnicos para investigação criminal, desde a descoberta das impressões digitais. Seu surgimento trouxe novos paradigmas para os critérios utilizados na formulação da culpabilidade em vários campos do Direito. A análise molecular de amostras de DNA tem sido utilizada com o objetivo de ajudar a solucionar investigações criminais, entre elas os crimes sexuais, e passou a ser rotina no contexto pericial em vários Estados do Brasil.

A partir de métodos altamente sensíveis, é possível amplificar sequências específicas do cromossomo Y, mesmo quando há pouco material disponível. O método de PCR se mostrou uma técnica sensível o suficiente para detectar esses fragmentos e trouxe grandes contribuições para a pesquisa por ser uma metodologia relativamente simples, rápida, barata em comparação com outros métodos utilizados, que deriva da amplificação exponencial de uma região de interesse do DNA ao longo dos ciclos de reação.

Neste trabalho, foram analisadas 132 amostras provenientes de vítimas de violência sexual no Estado do Espírito Santo, através da análise genética utilizando seis marcadores moleculares específicos do cromossomo Y.

5.1 VIABILIDADE DOS MARCADORES

Dos seis marcadores testados, cinco apresentaram resultados satisfatórios de detecção, amplificando a banda de interesse nos controles cujo DNA masculino estava presente e não apresentando bandas em DNA exclusivamente feminino. O marcador G66153 não foi considerado confiável, tendo em vista que amplificou fragmentos de interesse em todos os controles que continham somente DNA feminino.

A presença das bandas de interesse nos controles femininos pelo marcador G66153 pode ser explicada pelo fato de que existe uma região de correspondência de cerca de 90% no cromossomo 6, de acordo com Robinson e colaboradores (2006).

Carvalho e colaboradores (2007) relatam a amplificação satisfatória do marcador

G66153, porém sob diferentes circunstâncias. Sua análise foi realizada em material unicamente masculino, objetivando verificar a ocorrência de alteração cromossômica. No entanto, com os resultados deste presente trabalho, o marcador foi considerado inadequado para utilização em condições de mistura de DNA.

5.2 TESTE GENÉTICO – UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE DNA MASCULINO

Quando comparado com a análise citológica dos espermatozoides, o teste genético detectou 14 dentre as 17 amostras positivas, correspondendo a uma sensibilidade de 82%. A diferença apresentada pelos dois testes em questão pode ser justificada por fatores como a manipulação e o armazenamento inadequados das amostras, podendo acarretar na degradação do material genético masculino, além de fatores externos, como a degradação por microrganismos (ROMERO-MONTOYA et al., 2011). Na verdade, a contribuição individual e coletiva destes fatores é em grande parte desconhecida, devido à falta de informações sobre as condições de obtenção das amostras. Erros tanto na coloração quanto na análise citológica, também podem ter influenciado neste resultado (DE MOORS et al., 2013).

Dentre as 115 amostras negativas para a análise de espermatozoides, 29 se mostraram positivas com o teste genético. Destas 29 amostras, 10 apresentaram resultados positivos também no teste de PSA, o que reforça a possibilidade de contato sexual e, conseqüentemente, a presença de células viáveis.

Com relação ao teste de PSA, de 43 amostras positivas, 24 apresentaram o mesmo resultado no teste genético (56% de sensibilidade). A diminuição dos valores de acerto quando se compara a análise citológica de espermatozoides com o teste de PSA pode ser explicada pela diferença no objeto de análise nesses testes. Se por um lado a análise citológica busca por células, que contêm material genético, o teste de PSA avalia a presença de uma proteína que pode estar presente sem a presença de células viáveis.

Dentre os resultados mais significativos deste estudo, verificou-se que das 89 amostras negativas para PSA, 19 apresentaram resultado positivo para o teste

genético. Este número representa uma fração considerável, de cerca de 20%, de amostras que foram avaliadas como negativas pelos testes de triagem convencionais adotados pela Polícia Civil. Os resultados sugerem que estas amostras deveriam ter sido analisadas por métodos subsequentes, pois podem conter material potencialmente esclarecedor para as investigações. Verificou-se que as técnicas adotadas atualmente pela Polícia Civil podem não ser suficientemente eficazes para a detecção de material genético masculino nas amostras, e que uma fração considerável de provas podem deixar de fundamentar processos criminais. Com isso, destaca-se a importância da utilização do teste genético como um método simples e barato para potencializar o trabalho da perícia em casos de violência sexual.

Quando se avalia as taxas de acerto, busca-se a porcentagem de sucesso obtido no teste. Baseando-se nesse conceito, foram calculadas as taxas de acerto para cada marcador em diferentes condições.

O percentual de acerto foi de 75,4% quando comparado com as análises citológicas de espermatozóide e de 71,2 % na avaliação imunológica de PSA. Esses valores representam taxas de acerto muito acuradas, embora menores do que as apresentadas individualmente por alguns *primers*. A análise em conjunto dos dados agrega variáveis e nos permite minimizar a probabilidade de erros.

Em 2011, Romero-Montoya mostrou que seus resultados, utilizando-se os testes de SC, PSA e APA em amostras de estupro, variaram de 33% (todos os testes foram positivos) a 66% (pelo menos um teste positivo) entre os casos considerados conclusivos para a presença de sêmen. Seus resultados negativos sugerem a ausência de sêmen e DNA masculino mas indicam a avaliação da fração epitelial para permitir a obtenção de perfis Y-STR.

A fim de se verificar se houve diferenças nas amostras provenientes de vítimas vivas e cadáveres, as variáveis foram calculadas separadamente e são descritas abaixo.

5.3 AMOSTRAS DE VÍTIMAS VIVAS

Para as amostras de vítimas vivas, o marcador da Amelogenina e o marcador DYS270 apresentaram as melhores taxas de acerto, respectivamente 86,3% e 82,6%, quando comparadas aos resultados citológicos de presença de espermatozóides. Esses resultados foram ligeiramente abaixo dos valores encontrados no teste com todas as amostras em conjunto (respectivamente 86,4% e 83,3%).

Apresentaram, também, as melhores taxas de acerto quando comparadas ao teste de PSA (71,6% AMEL Y e 67,9% DYS270). As altas taxas de acerto indicam que há uma boa correspondência de resultados quando se compara com testes amplamente utilizados no campo científico. Quando comparados com os resultados encontrados na avaliação conjunta das amostras (teste genético), os valores apresentaram um ligeiro acréscimo (72,7% AMEL Y e 68,2% DYS270). Com isso, verifica-se que esses marcadores possuem uma utilização promissora para a detecção de DNA masculino em avaliações forenses.

Apesar de apresentar taxas menores, de 71,6% e 67,9% (quando comparado com os testes de SC e PSA, respectivamente), o marcador SRY D&E também apresenta resultados satisfatórios. Para o total de amostras, a taxa de acerto para PSA foi de 68,2% e para o SC foi de 74,2%.

Talthip e colaboradores (2007) afirmam que o tempo de degradação de proteínas pode ser acelerado em situações *post mortem*, o que pode explicar o aumento das taxas de acerto quando se descarta a avaliação das amostras de cadáveres. Outro fator a ser considerado é o tempo de coleta, muito menor nas vítimas vivas, o que influencia diretamente na qualidade do material genético.

O marcador que apresentou menor taxa de acertos foi o SRY F&G, apresentando valores abaixo de 50%. Esse marcador apresentou amplificação de muitos falso-

positivos, mesmo que os controles femininos não tenham sido amplificados durante as reações. O marcador DXYS96 apresentou, em todos os quesitos testados para essas amostras, desempenho insatisfatório; seus valores medianos de detecção podem demonstrar uma caracterização aleatória.

A proliferação bacteriana e fúngica natural de regiões de mucosa podem influenciar na degradação das células, e conseqüentemente do material alvo deste estudo. Outros fatores que colaboram para a má qualidade das amostras é falta de informações a respeito dos procedimentos pré-exame, tais como: menstruação, banho, tempo entre a agressão e o exame, entre outros (DELFIN et al., 2004).

5.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR DOS CADÁVERES VÍTIMADOS POR VIOLÊNCIA SEXUAL

Nas amostras provenientes de cadáveres, o marcador da Amelogenina, o marcador DYS270 e o SRY D&E, apresentaram as melhores taxas. Todos tiveram 87% de acerto, quando comparadas aos resultados citológicos de presença de espermatozoides. Comparando-se com os valores obtidos no teste geral, a constância na taxa de acerto do marcador da Amelogenina enaltece ainda mais suas qualidades na detecção. No entanto, acredita-se que o aumento das taxas de acerto para DYS270 e SRY D&E (quando comparadas com o conjunto amostral total) deve-se, provavelmente, pela drástica diminuição do número amostral, ao se analisar apenas cadáveres.

Considerando a comparação ao teste de PSA, novamente o marcador da Amelogenina mostrou a melhor taxa de acerto (78,2%), enquanto os marcadores SRY D&E, DYS270 e DXYS96 apresentaram taxa satisfatória de 69,5%. Normalmente apresentando valores intermediários, o marcador DXYS96 mostrou boa taxa de acerto entre as amostras de cadáveres, indicando a necessidade de novos testes com esse tipo de amostra para determinar sua real condição.

O marcador SRY F&G, apresentou, mais uma vez, baixas taxas de acerto, ficando abaixo dos 50% quando em ambos os testes.

Apesar do número reduzido de amostras de cadáveres (23 amostras), os resultados apontam taxas satisfatórias para a maioria dos marcadores testados, sugerindo que os mesmos também podem ser utilizados nos casos criminais de situações semelhantes.

5.5 ESPECIFICIDADE, SENSIBILIDADE E EXATIDÃO

A validação de teste é uma forma de determinar sua aptidão para um uso específico e, através dela, avaliar o quão bom o teste é na identificação de amostras com e sem uma condição. Sua validação envolve o cálculo de medidas objetivas de desempenho do teste, entre elas, a sensibilidade, a especificidade e a exatidão.

Quando se utiliza da sensibilidade, especificidade e exatidão em testes, o ideal seria que esses parâmetros apresentassem sempre taxas de 100%, mas o valor destas propriedades dependem da distribuição do resultado nas amostras e das implicações dos possíveis erros. A tentativa de melhorar a sensibilidade frequentemente tem o efeito de diminuir a especificidade e seu balanço é determinado pela escolha do exame e do ponto de corte corretos para cada estudo em particular (FLEISS, 1981).

A sensibilidade, especificidade e exatidão do teste genético, em que todos os marcadores foram avaliados em conjunto, mostraram resultados satisfatórios, pois apresentaram valores superiores a 75% na comparação com os resultados citológicos de presença de espermatozoides (padrão ouro). Cabe ressaltar que a sensibilidade do teste alcançou valores de 82%, demonstrando a grande capacidade do teste em reduzir a ocorrência de resultados falso-negativos, permitindo, assim, uma avaliação genotípica mais abrangente. A exatidão elevada corrobora os valores encontrados nesse teste.

Quando se comparou com os valores de PSA, a especificidade e a exatidão apresentaram constância nos resultados. A discrepância considerável foi o valor da sensibilidade, que ficou em torno de 55%, muito abaixo das expectativas. Tal redução pode ser explicada pelo aumento no número de falsos-negativos proporcionalmente ao número de verdadeiramente positivos. A diferença no objeto

de estudo entre os dois testes (DNA e PSA) e a ausência de células viáveis podem ter contribuído para a não detecção de DNA masculino pelos marcadores e, conseqüentemente, a sua caracterização como falso-negativo.

Ao se avaliar os marcadores separadamente, a sensibilidade mostrou resultados regulares, variando de 64% (AMEL Y) até 76% (SRY F&G) quando comparadas com o padrão ouro (SC) e até 30 pontos percentuais a menos na comparação com os resultados de PSA. A especificidade, por sua vez, apresentou resultados satisfatórios em 3 marcadores (AMEL Y, SRY D&E e DYS270 - acima de 75%), chegando a 89% no marcador da amelogenina. Resultados considerados insatisfatórios para este conceito foram obtidos nos marcadores SRY F&G e DXYS96, respectivamente 30% e 50%. Os valores de especificidade, quando comparados com os resultados de PSA, mantiveram correspondência numérica com os obtidos no padrão ouro, com uma variação máxima de três pontos percentuais.

A exatidão apresentou resultados bastante diversos, indicando uma variedade nas características de detecção de cada marcador. Se por um lado o AMEL Y obteve 86% de exatidão, mostrando sua consistência como marcador, SRY F&G obteve 35%. Seu baixo valor deve-se principalmente ao grande número de falso-positivos (em 61% das amostras). De maneira geral, a amplificação de tantos falso-positivos pelo SRY F&G mostra-se favorável no que se refere ao teste genético, por detectar DNA masculino em amostras consideradas negativas pela Polícia Civil. No entanto, por se tratar de um número bastante elevado de amostras falso-positivas, detectado por apenas um dos marcadores analisados, sugere-se cautela na utilização do marcador SRY F&G e recomenda-se seu uso sempre associado a outros marcadores que também apresentaram taxas de acerto elevadas, como a AMEL Y e o DYS270.

Apesar de o marcador SRY D&E apresentar bons índices dos conceitos avaliados e o SRY F&G os piores desse trabalho, estudos que usaram os *primers* de SRY (BOON et al., 2007 e PICCHIASSI et al., 2008), principalmente na detecção de DNA fetal masculino no sangue das mães, mostraram valores de sensibilidade que variaram de 66% a 100% e de especificidade em torno de 98%, ótimos resultados quando as condições de preservação, extração e análise da amostra são ótimas.

5.5.1- AMOSTRAS DE VÍTIMAS VIVAS E DE CADÁVERES

A fim de verificar possíveis diferenças entre amostras procedentes de cadáveres e de vítimas vivas, a sensibilidade, a especificidade e a exatidão foram calculadas separadamente.

A sensibilidade das amostras provenientes de cadáveres calculadas pelo padrão ouro manteve-se constante em todos os marcadores (65% aproximadamente). Porém, apresentaram queda de até 38 pontos percentuais quando se utilizou do teste de PSA como referência. Com exceção dos marcadores SRY F&G e DXYS96, os valores de sensibilidade das amostras das vítimas vivas mantiveram-se próximos de 65%. Quando calculadas pelo teste de PSA, mais uma redução nos valores foi notada, redução essa que não representa surpresa, uma vez que o foco do teste de PSA é uma proteína e a ausência de células viáveis é factível. Não houve, portanto, diferença de sensibilidade entre as amostras por sua origem.

A especificidade, por outro lado, mostrou bons resultados em três marcadores, ficando em torno de 90% para AMEL Y, tanto nas amostras de vítimas vivas quanto nas provenientes de cadáveres e com baixa diferença entre o padrão ouro (SC) e o PSA. SRY D&E e DYS270 apresentaram melhores valores nas amostras de cadáveres (90%) e uma pequena redução no valor quando calculado com o teste de PSA.

Os valores de exatidão, responsáveis por medir o grau de concordância entre os valores obtidos e os verdadeiros esperados, ficaram acima de 70% nas amostras de vítimas vivas e 80% nas de cadáveres nos marcadores AMEL Y, SRY D&E e DYS270, mostrando boa proximidade com os valores verdadeiros considerados pelo padrão ouro (SC). Não distante, os valores obtidos pela comparação com o teste de PSA, ficaram em torno de 70% para os mesmos marcadores, corroborando os resultados obtidos no padrão ouro.

Os marcadores SRY F&G e o DXYS96, mais uma vez se destacam pelos resultados incoerentes em todos os parâmetros testados, apresentado elevados valores de sensibilidade, justificáveis pelo excesso de resultados positivos, correspondendo na

maioria dos casos com as amostras verdadeiramente positivas, mas gerando muitos falso-positivos, refletindo em valores insatisfatórios de especificidade e exatidão. Sugere-se, portanto, que, em análises futuras, sejam utilizados preferencialmente os marcadores que apresentaram resultados mais satisfatórios. Nos casos em que forem utilizados o SRY F&G e o DXYS96, os mesmos devem ser analisados em associação a outros marcadores.

Assim como Sartori em 2008, que obteve seus melhores resultados na detecção de porções do cromossomo Y, em uma proporção inferior a 0,1% de DNA feminino utilizando os *primers* SRY D&E e AMEL Y, o presente trabalho pôde caracterizar, com ótimos resultados, os mesmos marcadores (AMEL Y e SRY D&E) e o DYS270 como ferramenta viável para a detecção de DNA masculino em misturas de DNA em amostras de suabe de vítimas de agressão sexual.

De uma forma geral, as análises dos fragmentos estudados foram satisfatórias, permitindo a identificação de amostras cuja presença de DNA exógeno masculino representa fonte potencial de material para investigações posteriores.

6 *Conclusões*

6 CONCLUSÕES

A necessidade da produção de provas concretas e mais confiáveis para o combate ao crime, em especial à violência sexual contra a mulher, representa desafio constante para a ciência forense. As técnicas moleculares que utilizam marcadores genéticos mostram-se como caminho promissor na materialização do crime e identificação do suspeito, permitindo que os culpados sejam punidos e as vítimas assistidas com rapidez.

Diante desse quadro, amostras de 132 mulheres do estado do Espírito Santo foram analisadas pela genética molecular, através da utilização de marcadores específicos do cromossomo Y para a pesquisa de DNA masculino.

- a) Foram encontrados marcadores com uma alta taxa de acertos quando comparados com os testes “padrão ouro” para a pesquisa de contato sexual criminoso.
- b) Os marcadores AMEL Y, SRY D&E e DYS270 apresentaram os melhores resultados de taxa de acertos, sensibilidade, especificidade e exatidão.
- c) Dezenove amostras tiveram indicação para análises subsequentes, pois apresentaram resultados positivos neste trabalho, apesar de serem avaliadas como negativas pelo teste citológico para espermatozóide e pelo teste de PSA.
- d) Altos valores de sensibilidade e especificidade foram encontrados, corroborados com valores de exatidão satisfatórios.
- e) Não foi encontrada diferença significativa entre os resultados das amostras procedentes de vítimas vivas e de cadáveres.
- f) A técnica desenvolvida no trabalho mostrou-se eficiente para detectar DNA masculino e promissora para utilização nas rotinas forenses.

7 Referências

ALLERY J.P., TELMON N., MIEUSSET R., BLANC A., ROUGÉ D.. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci* 46(2),349–351, 2001.

ANU BASHAMBOO G.H.M. T; AZFER MD. A. e ALI S., 'Genomics of the Human Y Chromosome and Molecular Diagnosis', *Indian Nat Sci Acad*, B69, 13, 2003.

AVENT, N.D.; CHITTY, L.S. Non-Invasive Diagnosis of Fetal Sex; Utilization of Free Fetal DNA in Maternal Plasma and Ultrasound. *Prenatal Diagnosis*, v. 26, p. 598-603, 2006.

BALLANTYNE K. N., KEERL V., WOLLSTEIN A., CHOI Y., ZUNIGA S. B., RALF A., VERMEULEN DE KNIJFF M., P., E KAYSER M., 'A New Future of Forensic Y-Chromosome Analysis: Rapidly Mutating Y-Strs for Differentiating Male Relatives and Paternal Lineages. *Forensic Sci Int Genet*, v6 , p208-218, 2012.

BARALDI, A. M.. Utilização da técnica de identificação genética: panorama da realidade dos serviços oficiais de identificação brasileiros e a importância da atuação do cirurgião-dentista na equipe forense. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 77p, 2008.

BENSCHOP C. C., WIEBOSCH D. C., KLOOSTERMAN A. D., E SIJEN T.. Post-Coital Vaginal Sampling with Nylon Flocked Swabs Improves DNA Typing. *Forensic Sci Int Genet*, v4, p115-21, 2010.

BIANCHI, D.W. Fetomaternal Cell Traffic, Pregnancy-Associated Progenitor Cells, and Autoimmune Disease. *Best. Pract. Res. Clin .Obstet. Gynaecol.*, v. 18, p. 959-975, 2004.

BOON, E.M.J; SCHLECHT, H.B.; MARTIN, P.; DANIELS, G.; VOSSEN, R.H.A.M.; DEN DUNNEN, J.T.; BAKKER, B.; ELLES, R. Y Chromosome Detection by Real Time PCR and Pyrophosphorolysis-Activated Polymerisation Using Free Fetal DNA Isolated from Maternal Plasma. **Prenatal Diagnosis**, v. 27, p.932-937, 2007.

BORÉM, A.; FERRAZ, D.A.; SANTOS, F.. DNA e Direito. *Biotec Ciênc & Desenv*, n. 22, set-out, 2001.

BUTLER, J. M.. Fundamentals of Forensic DNA Typing, 2010. Acessado em 15 setembro 2013. Disponível no site:<http://books.google.com.br/books?id=-OZeEmqzE4oC&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>

CARVALHO F. M., WOLFGRAMM E. DEGASPERI V., I., VERBENO B. M., VIANNA B. A., CHAGAS F. F., PERRONI A. M., PAULA F., e LOURO I. D.. Molecular Cytogenetic Analysis of a Ring-Y Infertile Male Patient. *Genet Mol Res*, v. 6, p. 59-66, 2007.

CHEN J.T., HORTIN G.L.. Interferences with semen detection by an immunoassay for a seminal vesicle-specific antigen. *J. Forensic Sci*, v45, 234–235, 2000.

COUTO, S. P.. Manual da investigação forense: Conheça as técnicas utilizadas para desvendar os grandes crimes. Ed. Ideia e ação, São Paulo, p.143, 2010. Caput LOCARD E.. L'enquete criminelle et les methodes scientifiques. Flammarion, Paris,1920.

DA SILVA D. A., GOES A. C., DE CARVALHO J. J., e DE CARVALHO E. F.. DNA Typing from Vaginal Smear Slides in Suspected Rape Cases. *Sao Paulo Med J*, 122, 70-2, 2004.

DEKAIRELLE A.F., HOSTE B.. Application of a Y-STR pentaplex PCR (DYS19, *DYS389I* and *II*, *DYS390* and *DYS393*) to sexual assault cases. *Forensic Sci Int*,v. 118, p. 122–5, 2001.

DELFIN, F. C.,MADRID, B. J.,TAN, M. P.,DE UNGRIA, M. C.. Y-STR analysis for detection and objective confirmation of child sexual abuse. *Int J Legal Med*, v.119, p. 158-163, 2004.

DE MOORS A., GEORGALIS T., ARMSTRONG G., MODLER J., e FREGEAU C. J.. Sperm Hy-Liter: An Effective Tool for the Detection of Spermatozoa in Sexual Assault Exhibits. *Forensic Sci Int Genet*, 7, 367-79, 2013.

DENISON S.J., LOPES E.M., D'COSTA L., NEWMAN J.C.. Positive prostate-specific antigen (PSA) results in semen-free samples. *Can Soc Forensic Sci J*, v. 37(4), p. 197-206, 2004.

D'ESPOSITO, M.; CICCODICOLA, A.; GIANFRANCESCO, F.; ESPOSITO, T.; FLAGIELLO, L.; MAZZARELLA, R.; SCHLESSINGER, D.; D'URSO, M. A.. Synaptobrevin Like Gene in the Xq28 Pseudoautosomal Region Undergoes X Inactivation. *Nat. Genet.*, v. 13, p. 227-229, 1996.

DOLINSKY, L.C.; PEREIRA, L.M.C.V. DNA Forense. Saúde e ambiente em Revista, Duque de Caxias, v.2, n.2, p.11-22, jul-dez. 2007.

DROBNIC, K. A New Primer Set in a SRY Gene for Sex Identification. *International Congress Series*, v. 1288, p. 268-270, 2006.

DUARTE, F.; PEREZ, A.; PENA, S.; DE BARROS, M. ; ROSSI, E.. A avaliação do DNA como prova forense. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 283, 2001.

ENSMINGER, A.L.; HOFFMAN, S.M.G. Sex Identification Assay Useful in Great Apes is Not Diagnostic in a Range of other Primate Species. *American Journal of Primatology*, v. 56, p. 129-134, 2002.

FEDDER J.. Nonsperm cells in human semen: with special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility. *Arch Androl* 1996; 36(1):41–65.

FLEISS, J.L.. Statistical methods for rates and proportions. 2nd ed. New York, ed John Wiley& Sons,1981.

FUQUA J. S., MCLAUGHLIN J., PERLMAN E. J., e BERKOVITZ G. D.. Analysis of the Sry Gene in Gonadal Tissue of Subjects with 46,Xy Gonadal Dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 82, p. 701-2, 1997.

GRAVES J. A. e FOSTER J. W.. Evolution of mammalian sex chromosomes and sex determining genes. *Int. Rev.Cytol*, v. 154, p. 191-259, 1994.

GILL P., JEFFREYS A.J., WERRETT D.J.. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, v. 318, p. 577-9, 1985.

GRAVES H.C.B., SENSABAUGH G.F., CRIM D., BLAKE E.T.. Postcoital detection of a male specific semen protein. Application to the investigation of rape. *New Eng. J. Med.*, v. 312, p. 338-343, 1985.

GRAVES, J.A.M.. The Rise and Fall of SRY. *Trends in Genetics*, v. 18, p. 259-264, 2002.

HANSON, E.K.; BALLANTYNE, J.. Comprehensive annotated STR physical map of the human Y chromosome: forensic implications. *Legal Medicine*, v. 8, p. 110-20, 2006.

HAQQ, C.M.; KING, C.; UKIYAMA, E.; FALSAFI, S.; HAQQ, T.N.; DONAHOE, P.K.; WEISS, M.A.. Molecular Basis of Mammalian Sexual Determination: Activation of Mullerian Inhibiting Substance Gene Expression by SRY. *Science*, v. 226, p. 1494-1500, 1994.

HEARD, E.. Delving Into the Diversity of Facultative Heterochromatin: the Epigenetics of the Inactive X Chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v.15, p. 482-489, 2005.

HERR J.C., SUMMERS T.A., MCGEE R.. Characterization of a monoclonal antibody to a conserved epitope on human seminal vesicle-specific peptides: a novel probe/marker system for semen identification. *Biol Reprod*, v. 35, p. 773-84, 1986.

IJSN - Instituto Jones Dos Santos Neves. Informações criminais do Espírito Santo. Boletim Criminalidade v 05, 2012.

IJSN - Instituto Jones Dos Santos Neves. Ocorrências registradas na delegacia de atendimento a mulher - DEAM no período de 2004-2006. Coordenação De Estudos Sociais – CES. 2006.

INTURRI S.; ROBINO C.; GINO S.; CARATTI S.; TORRE C.. Integration of the AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit with SRY-specific primers for gender identification. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v. 2, p. 36-37, 2009.

IWAMURA, E.S.M.; MUÑOZ, D.R.. Análise de DNA em medicina legal, banco de dados e controle de qualidade. *Saúde, Ética & Justiça*, v. 18(1/2), p.13-7, 2003.

TALTHIP J., CHIRACHARIYAVEJ T., PEONIM V., ATAMASIRIKUL K., TEERAKAMCHAI S.. An Autopsy Report Case of Rape Victim by the Application of PSA Test Kit as a New Innovation for Sexual Assault Investigation in Thailand. *J Med Assoc Thai*, v. 90,p 348-351, 2007.

JEFFREYS, A.J.; BROOKFIELD, J. F.; SEMEONOFF, R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, v.317, p.818-819, 1985.

JOBLING M.A., LO I.C., TURNER D.J., BOWDEN G.R., LEE A.C., XUE Y., CARVALHO-SILVA D., HURLES M.E., ADAMS S.M., CHANG Y.M., KRAAIJENBRINK T., HENKE J., GUANTI G., MCKEOWN B., VAN OORSCHOT R.A., MITCHELL R.J., DE KNIJFF P., TYLER-SMITH C., PARKIN E.J.. Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. *Hum. Mol. Genet*, v. 16, p. 307–316, 2007.

KAFAROWSKI E, DANN K, FRAPPIER JRH, NEWMAN JC.. Examination of semen-free vaginal swabs for p30 using the SERATEC PSA test kit: a further evaluation of the specificity of p30/PSA for semen identification. In:MAAFS, MAFS, SAFS, CSFS *joint meeting*, p. 19e24, 2004.

KAYSER M., CAGLIA A., CORACH D., FRETWELL N., GEHRIG C., GRAZIOSI G., HEIDORN F., HERRMANN S., HERZOG B., HIDDING M., HONDA K., JOBLING M., KRAWCZAK M., LEIM K., MEUSER S., MEYER E., OESTERREICH W., PANDYA A., PARSON W., PENACINO G., PEREZLEZAUN A., PICCININI A., PRINZ M., SCHMITT C., SCHNIEDER P.M., SZIBOR R., TEIFELGRODING J., WEICHHOLD G., DE KNIJFF P., ROEWER L.. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int. J. Legal Med*, v. 110, p. 125–133, 1997.

KHALDI N., MIRAS A., BOTTI K., BENALI L., GROMB S.. Evaluation of three rapid methods for the forensic identification of seminal fluid in rape cases. *J. Forensic Sci*, v. 49, p. 1–5, 2004.

LAFFAN A., SAWYER I., QUINONES I., DANIEL B.. Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. *Med Sci Law* 2011 Jan;51(1):11e7.

LABERKE P. J., GROSSENBACHER R., HAUSMANN R., E BALITZKI B.. Method to Predict the Chance of Developing a Male Profile out of Mixtures of Male and Female DNA. *Int J Legal Med*, v.126, p.157-60, 2012.

Ministério da Saúde – Brazil. Prevenção e tratamento dos agravos resultantes da violência sexual contra mulheres e adolescentes – norma técnica,1ªedição, 1998, <http://www.saude.gov.br>

MARTINS T.M.V..Y-miniSTR: alternativa para a análise de amostras “complicadas” - Estudo da população do Norte de Portugal. Dissertação de Mestrado, Porto-Portugal, 84fl., 2008.

MENEZES P.R.. Validade e confiabilidade das escalas de avaliação em psiquiatria. *Rev Psic Clin*, v25, n 5, 2012.

MORETI, T. Identificação humana: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina. . Dissertação (Mestrado) - Santa Catarina, 2009. 145f

NAKAHORI Y, TAKENAKA O, NAKAGOME Y. A human X-Y homologous region encodes amelogenin. *Genomics* 1991;9:264e9.

NIJ - NATIONAL INSTITUTE OF JUSTICE. The future of forensic DNA testing: predictions of the research and development working group of the National Commission on the future of DNA evidence. Washington, DC, 2000. Acesso em: 10 agosto de 2013.

OLSON M., HOOD L. CANTON C., BOTSTEIN D.. A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, v. 29, p.1434-5, 1989.

PICCHIASSI, E.; COATA, G.; FANETTI, A.; CENTRA, M.; PENNACCHI, L.; RENZO, G.C.D. The Best Approach for Early Prediction of Fetal Gender by Using Free Fetal DNA from Maternal Plasma. **Prenatal Diagnosis**, v.28, p. 525-530, 2008.

PRINZ M., BOLL K., BAUM H., SHALER R.. Multiplexing of Y-chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Sci Int*, v.85, p.209–18, 1997.

RAO A.R., MOTIWALA H.G., KARIM O.M.. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int*, v.101(1), p.5-10, 2008.

ROBINSON J., WALLER M.J., FAIL S.C., MARSH S.G.. The IMGT/HLA and IPD databases. *Hum Mutat*, v. 27, p. 1192-9, 2006.

ROEWER L.. Y Chromosome Str Typing in Crime Casework. *Forensic Sci Med Pathol*, v.5, p.77-84, 2009.

ROMERO-MONTOYA L., MARTINEZ-RODRIGUEZ H., PEREZ M. A., e ARGUELLO-GARCIA R.. 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*, v.206, p.111-8, 2011.

ROSS, M.T.; GRAFHAM, D.V.; COFFEY, A.J.; et al.. The DNA Sequence of the Human X Chromosome. *Nature*, v. 434, p. 325-337, 2005.

RUANO G., BRASH D.E., KIDD K.K.. PCR: the first few cycles. *Amplifications*, v.7, p.1–4, 1991.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, v. 1, ed. 2, 1989.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.G.. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v. 17, p. 915-919, 1994.

SARTORI M.P.D.. Determinação do sexo fetal através da análise molecular do sangue e do plasma em diferentes idades gestacionais. Monografia do curso de Ciências Biológicas – UFES, 2008.

SATO I., KOJIMA K., YAMASAKI T., YOSHIDA K., YOSHIKE M., TAKANO S.. Rapid detection of semenogelin by one-step immunochromatographic assay for semen identification. *J Immunol Methods*, v. 287, p. 137-45, 2004.

SENSABAUGH G.F.. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci*, v.23, p. 106–15, 1978.

SHAH, V.C.; SMART, V. Human Chromosome Y and SRY. *Cell Biology International*, v. 20 (1), p. 3-6, 1996.

SHEWALE J.G., SIKKA S.C., SCHNEIDA E., SINHA S.K.. DNA profiling of azoospermic semen samples from vasectomized males by using Y-PLEX 6 amplification kit. *J Forensic Sci*, v.48, p.127–9, 2003.

SIBILLE I., DUVERNEUIL C., LORIN DE LA GRANDMAISON G., GUERROUACHE K., TEISSIERE F., DURIGON M., e DE MAZANCOURT P.. Y-Str DNA Amplification as Biological Evidence in Sexually Assaulted Female Victims with No Cytological Detection of Spermatozoa. *Forensic Sci Int*, v.25, p.212-6, 2002.

SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; PALMER, M.S.; HAWKINS, J.R.; GRIFFITHS, B.L.; SMITH, M.J.; FOSTER, J.W.; FRISCHAUT, A.M.; BADGE, R.L.B.; GOODFELLOW, P.N.. A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif. *Nature*, v. 346, p. 240-244, 1990.

SOARES-VIEIRA J. A., BILLERBECK A. E., IWAMURA E. S., ZAMPIERI R. A., GATTAS G. J., MUNOZ D. R., HALLAK J., MENDONCA B. B., E LUCON A. M.. Y-Strs in Forensic Medicine: DNA Analysis in Semen Samples of Azoospermic Individuals. *J Forensic Sci*, v.52, p.664-70, 2007.

STURGEON C.M., ELLIS A.R.. Improving the comparability of immunoassays for prostate-specific antigen (PSA): progress and problems. *Clin. Chim. Acta*, v.381, p.85–92, 2007.

TOZZO P., GIULIODORI A., CORATO S., PONZANO E., RODRIGUEZ D., e CAENAZZO L.. Deletion of Amelogenin Y-Locus in Forensics: Literature Revision and Description of a Novel Method for Sex Confirmation. *J Forensic Leg Med*, v.20, p.387-91, 2013.

VIEIRA, D.P.. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Disponível em: http://www.credesh.ufu.br/sites/credesh.ufu.br/files/documento/Principios_da_PCR_IPEN.pdf Acessado em: 15 dez. 2012.

VON WURMB-SCHWARK N. , BOSINSKI H., e RITZ-TIMME S.. What Do the X and Y Chromosomes Tell Us About Sex and Gender in Forensic Case Analysis?. *J Forensic Leg Med*, v.14, p.27-30, 2007.

WALSH, S.J.. Legal perceptions of forensic DNA profiling Part I: A review of the legal literature. *For Sci Int*, v.155, p.51-60, 2005.

WILLARD, H.F.. Tales of the Y Chromosome. *Nature*, v.423, p.810-811, 2003.

Anexos

ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE DNA MASCULINO POR PRIMERS ESPECÍFICOS DO CROMOSSOMO Y EM SWAB DE SUPOSTAS VÍTIMAS DE ESTUPRO COM NEGATIVA EM TESTE DE TRIAGEM PARA ESPERMATOZÓIDES

Pesquisador: Iuri Drumond Louro

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 13592513.8.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde ((CCS-UFES))

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 237.293

Data da Relatoria: 27/03/2013

Apresentação do Projeto:

A análise do DNA pode ser considerada um dos principais progressos técnicos para investigação criminal desde a descoberta das impressões digitais. Foi incorporada à rotina forense pelas polícias de países do primeiro mundo e começa a ser introduzida no contexto pericial em alguns Estados do Brasil. A violência sexual vem sendo crescentemente abordada nas ciências forenses, considerando os agravos ao bem-estar da mulher. Um dos problemas históricos nos estudos de vestígios de violência sexual é a presença, quase que exclusivamente, de uma mistura de sêmen e outro líquido corporal o que representa um problema sério para os exames sorológicos tradicionais de tipagem, pois em aproximadamente dois terços dos casos, não há possibilidade de se identificar o sêmen do doador pelo fato de a mistura dos fluidos biológicos resultarem em uma mistura de tipos sorológicos. Por estas razões, o emprego do exame de DNA como ferramenta auxiliar na elucidação de crimes e na identificação de pessoas é tema de grande repercussão na sociedade. Este projeto visa o desenvolvimento de uma metodologia nova para análise de seqüências STR do cromossomo Y de modo altamente sensível, capaz de detectar DNA masculino em diferentes regiões do cromossomo Y utilizando primers de regiões distintas de Y, de modo a amplificar suas regiões conservadas e identificar DNA masculino do suposto estuprador. Através da

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



metodologia proposta, esperamos conseguir amplificar sequências de cromossomo Y em swabs de mulheres estupradas que não evidenciaram presença de espermatozóides microscopicamente e assim, será possível obter uma melhor tecnologia para avaliar as evidências de violência sexual, permitindo identificar o agressor com mais precisão e sensibilidade e, conseqüentemente gerar provas mais confiáveis.

Objetivo da Pesquisa:

desenvolvimento de uma metodologia nova para análise de sequências do cromossomo Y de modo altamente sensível, capaz de detectar DNA masculino em diferentes regiões, presente em amostras de swab vaginal de mulheres vítimas de suposto estupro, mas sem vestígios microscópicos de espermatozóides . O teste irá utilizar primers de regiões distintas de Y, de modo a amplificar suas regiões conservadas. Objetiva-se desta forma identificar DNA masculino do estuprador em amostras triadas negativamente para a presença de espermatozóides.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: não há.

Benefícios: Através dessa análise poderá ser detectada presença de DNA masculino nos swabs negativos para esperma, excluindo o suspeito ou identificando a patrilineagem do estuprador. Trata-se de um projeto ousado, com chances de criar uma metodologia capaz de aumentar enormemente o poder de detecção de DNA masculino em amostras degradadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

adequadamente desenhada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

presentes e adequados.

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Telefone: (27)3335-7211

Município: VITORIA

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



VITORIA, 04 de Abril de 2013

Assinador por:
DANIELLE CABRINI MATTOS
(Coordenador)

ANEXO II – TABELA GERAL DE RESULTADOS DE AMPLIFICAÇÃO

Nº	Origem	Tipo	SRY D&E	SRY F&G	DXYS96	DYS270	AMEL Y	SPTZ	PSA
1	Vivo	Vag	+	+	+	+	+	+	+
2	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	+	+
3	Vivo	Vag	+	+	+	-	-	-	+
4	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
5	Vivo	Vag	-	+	+	+	-	-	-
6	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	+
7	Cad	Vag	-	+	+	+	-	+	+
8*	Cad	Vag	-	+	+	+	-	-	-
9*	Cad	Anal	P	P	P	P	P	-	-
10	Vivo	Vag	+	+	+	+	+	+	+
11	Vivo	Vag	+	+	+	+	+	+	+
12	Vivo	Vag	-	+	+	+	-	-	+
13*	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
14*	Vivo	Anal	-	+	-	-	-	-	-
15**	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
16**	Vivo	Anal	-	+	+	-	-	-	-
17	Vivo	Vag	-	-	+	-	P	-	-
21	Vivo	Vag	-	-	+	-	-	-	+
22	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
23	Vivo	Vag	-	+	+	-	P	-	+
24	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
25	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-
26*	Vivo	Anal	-	+	-	-	-	-	-
27*	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
28**	Vivo	Anal	-	-	-	-	-	-	+
29**	Vivo	Vag	+	+	+	+	+	+	+
30	Vivo	Vag	-	+	+	-	P	-	-
31	Vivo	Vag	P	+	+	+	-	-	-
32	Vivo	Vag	P	+	+	+	+	+	+
33*	Vivo	Anal	-	-	-	-	-	-	-
34*	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-
36	Vivo	Vag	P	+	+	P	P	-	-

Tabela Geral De Resultados De Amplificação (continuação)

Nº	Origem	Tipo	SRY D&E	SRY F&G	DXYS96	DYS270	AMEL Y	SPTZ	PSA
37	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
38	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	+	+
39	Vivo	Vag	+	+	+	P	P	-	-
40	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
41	Vivo	Vag	-	+	P	P	P	-	-
42	Vivo	Vag	-	+	+	+	-	+	+
43	Vivo	Vag	+	+	+	-	P	-	+
47	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-
48	Vivo	Vag	-	+	+	P	P	-	-
49	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
50	Vivo	Vag	-	-	+	-	-	-	-
51*	Vivo	Anal	+	+	-	-	-	-	-
52*	Vivo	Vag	P	+	+	+	-	-	-
53	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	+
54	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-
55	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-
56	Vivo	Anal	-	+	-	-	-	-	-
57*	Vivo	Anal	-	-	-	-	-	-	+
58*	Vivo	Vag	P	-	P	-	-	-	+
59	Vivo	Vag	+	+	+	-	-	-	+
590	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-
60A*	Cad	Anal	-	+	-	-	-	-	-
60V*	Cad	Vag	-	+	+	-	-	-	-
601	Cad	Vag	+	+	-	-	+	+	+
602	Cad	Vag	P	+	-	-	-	-	-
62	Cad	Vag	-	+	+	-	+	-	+
63	Cad	Vag	-	-	-	-	-	-	-
64*	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	+
65*	Vivo	Anal	-	-	-	-	-	-	+
66*	Vivo	Oral	-	+	-	-	-	-	-
67	Vivo	Vag	P	+	+	-	-	-	-

Tabela Geral De Resultados De Amplificação (continuação)

Nº	Origem	Tipo	SRY D&E	SRY F&G	DXYS96	DYS270	AMEL Y	SPTZ	PSA
68	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
69*	Vivo	Anal	-	-	+	-	-	-	-
70*	Vivo	Vag	+	+	+	-	+	-	-
72	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
73	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
74	Vivo	Vag	+	+	+	-	-	-	-
75*	Vivo	Oral	-	+	+	-	-	-	-
76*	Vivo	Vag	+	+	+	-	-	-	-
77	Vivo	Vag	+	+	+	+	-	-	-
78*	Vivo	Vag	+	-	-	-	+	-	-
79*	Vivo	Anal	+	+	-	-	-	-	-
80	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-
81	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
82	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
83*	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	+
84*	Vivo	Anal	+	+	+	+	+	-	-
85	Vivo	Vag	-	+	+	+	-	-	-
86	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
87	Vivo	Vag	+	+	+	+	+	+	+
88	Cad	Vag	+	-	+	+	+	+	+
89	Vivo	Vag	+	-	-	-	-	-	-
90	Vivo	Vag	-	-	+	-	-	-	-
92	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
93	Vivo	Vag	+	-	+	+	+	-	+
95	Vivo	Vag	+	+	+	+	+	-	+
96	Vivo	Vag	-	+	P	+	-	-	-
97*	Vivo	Vag	+	+	+	-	+	-	+
98*	Vivo	Oral	+	+	+	-	-	-	+
99	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	-	-
100	Vivo	Vag	+	+	+	-	+	-	-
101*	Vivo	Anal	-	+	-	-	-	-	-
102*	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-

Tabela Geral De Resultados De Amplificação (continuação)

Nº	Origem	Tipo	SRY D&E	SRY F&G	DXYS96	DYS270	AMEL Y	SPTZ	PSA
103	Vivo	Vag	-	+	P	P	P	-	-
104	Vivo	Vag	+	+	+	-	-	-	-
106*	Cad	Anal	-	-	-	-	-	-	-
107*	Cad	Vag	+	+	-	-	-	-	-
108**	Cad	Vag	+	-	P	P	+	-	-
109**	Cad	Oral	-	+	+	-	-	-	-
110**	Cad	Anal	-	-	-	-	-	-	-
111	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	+
112*	Vivo	Anal	+	+	-	-	-	-	+
113*	Vivo	Vag	P	+	+	-	P	-	+
114**	Cad	Vag	-	+	+	P	-	-	+
115**	Cad	Anal	-	+	-	-	-	-	+
116	Vivo	Vag	+	+	+	+	+	+	+
117*	Cad	Vag	-	+	-	P	P	-	-
118*	Cad	Anal	P	+	-	-	-	-	-
119	Vivo	Vag	+	+	+	+	+	+	+
120	Vivo	Vag	+	+	+	-	-	+	+
121	Vivo	Vag	+	+	+	-	-	-	-
122	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-
123	Vivo	Vag	+	+	+	-	-	-	-
124	Vivo	Vag	+	+	+	-	+	+	+
125*	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
126*	Vivo	Anal	-	+	-	-	-	-	-
127	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
128*	Cad	Vag	-	+	-	-	-	-	-
129*	Cad	Anal	P	+	+	+	-	-	-
131	Vivo	Anal	+	+	+	+	+	-	-
132*	Vivo	Vag	-	-	-	-	-	+	+
133*	Vivo	Anal	+	+	+	+	+	-	-
134**	Cad	Anal	-	-	-	-	-	-	-
135**	Cad	Vag	-	-	-	-	-	-	+
136	Vivo	Vag	-	+	-	-	-	-	-

Tabela Geral De Resultados De Amplificação (continuação)

Nº	Origem	Tipo	SRY D&E	SRY F&G	DXYS96	DYS270	AMEL Y	SPTZ	PSA
137*	Vivo	Anal	+	+	+	-	-	-	+
138*	Vivo	Vag	P	+	P	+	P	-	-
139**	Vivo	Anal	+	+	+	+	+	-	-
140**	Vivo	Vag	-	+	+	-	-	-	-
141	Vivo	Vag	-	+	+	-	P	-	-

Legenda: “+” amplificação do fragmento (resultado positivo)

“-“ não amplificação do fragmento (resultado negativo)

“P” resultado prejudicado