



UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

Joana Raquel Fernandes Ferreira

**QUANTIFICAÇÃO DE ADN vs.  
DETERMINAÇÃO DA NATUREZA DE  
MATERIAL BIOLÓGICO: VALORIZAÇÃO DE  
RESULTADOS EM PERÍCIAS DE NATUREZA  
SEXUAL**

**VOLUME 1**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses orientada pelo Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte-Real Gonçalves e pela Dr.<sup>a</sup> Maria João Anjos Porto e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Joana Raquel Fernandes Ferreira

**QUANTIFICAÇÃO DE ADN VS.  
DETERMINAÇÃO DA NATUREZA DE  
MATERIAL BIOLÓGICO: VALORIZAÇÃO DE  
RESULTADOS EM PERÍCIAS DE NATUREZA  
SEXUAL**

VOLUME 1

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências  
Forenses orientada pelo Professor Doutor Francisco Manuel  
Andrade Corte-Real Gonçalves e pela Dr.<sup>a</sup> Maria João Anjos Porto  
e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de  
Coimbra.**

Setembro de 2022



# Agradecimentos

A presente dissertação teve o contributo direto e indireto de inúmeras pessoas, cujo incentivo e dedicação foram fundamentais para a sua concretização.

Declaro os meus estimados agradecimentos:

Ao Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves, orientador desta dissertação, pela sua constante disponibilidade e conhecimento científico transmitido ao longo destes dois anos de Mestrado.

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Maria João Porto, pelos seus conhecimentos científicos enriquecedores, pela sua sincera dedicação, pela sua ajuda incansável, pela sua disponibilidade e motivação, essenciais para a realização deste projeto, a minha eterna gratidão.

À Diretora de Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro, Dr.<sup>a</sup> Lisa Sampaio, por ter autorizado a realização do trabalho da minha dissertação neste laboratório tão prestigiado e por todo o seu auxílio.

À Dr.<sup>a</sup> Ana Margarida Bento, pela sua dedicação, disponibilidade e conhecimentos, aos quais estarei eternamente grata.

À Doutora Vanessa Bogas, pela sua ajuda imprescindível, incentivo e a todo o conhecimento fornecido.

Aos restantes colaboradores do Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro, Dr. Armando Serra, Dr.<sup>a</sup> Marta São-Bento, Dr.<sup>a</sup> Nair Gouveia, Patrícia Cunha, Dr. Pedro Brito, Dr.<sup>a</sup> Virgínia Lopes e Dr.<sup>a</sup> Alena Shastakova, pela forma como me acolheram, pela sua dedicação, auxílio e sabedoria prestados ao longo deste tempo, imprescindíveis para a minha aprendizagem.

Às minhas colegas de Mestrado que estiveram no Serviço comigo, por todas as palavras, conversas, apoio que me deram e pela amizade desenvolvida.

Ao meu André, por nunca deixar de acreditar nas minhas capacidades, pela companhia, apoio incondicional e por todas as energias positivas que pintou ao longo deste meu percurso.

Aos meus pais, por me terem dado a oportunidade de investir na minha formação e pelo apoio dado. À minha irmã por todas as sugestões enriquecedoras. À minha querida avó Cinda, por todo o carinho, paciência e por acreditar em mim. À minha prima Paula e ao meu padrinho, por todo o auxílio e dedicação que tiveram para comigo durante este meu percurso.

A todos o meu sincero Muito Obrigada!



## Resumo

Os crimes de natureza sexual são um dos delitos mais investigados no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., sendo importante determinar a presença de material genético masculino, de forma a comprovar a ocorrência do crime.

Os testes preliminares de orientação e de certeza utilizados no Serviço de Genética e Biologia Forenses para pesquisa de sémen, particularmente o teste do Antígeno Específico da Próstata e o de *Christmas Tree*, respetivamente, têm demonstrado um elevado interesse forense. Contudo, o serviço detetou que em várias perícias sexuais realizadas, não era determinado qualquer perfil genético de origem masculina ou haplótipo associado, apesar do resultado de o teste preliminar de orientação ser positivo.

Com este estudo, pretendeu-se avaliar o fluxo de trabalho laboratorial atualmente implementado no Serviço de Genética e Biologia Forenses para a pesquisa de sémen quanto à necessidade de realizar os testes preliminares em todas as amostras que eram recebidas com indicação de pesquisa de material biológico de origem masculina. Para tal, avaliaram-se 647 amostras de perícias de natureza sexual realizadas nos anos 2020 e 2021.

Verificou-se que apenas 39.6 % dessas amostras continham um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e, como tal, necessitariam de realizar os testes preliminares. A quantidade de ADN masculino influenciava os resultados dos testes preliminares para pesquisa de sémen, sendo que pequenas quantidades de ADN podiam impedir a sua positividade. Se apenas se realizassem os testes preliminares nestas amostras, haveria um decréscimo de 60.4 % do custo e tempo despendidos no teste do Antígeno Específico da Próstata, bem como um decréscimo de 47.2 % do tempo despendido na observação microscópica do teste de *Christmas Tree*.

Por sua vez, 60.4 % das amostras não possuíram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, não existindo necessidade de realizar os testes preliminares. Estas amostras continham maioritariamente uma quantidade muito reduzida ou até mesmo nula de material genético masculino.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agressão sexual; Pesquisa de sémen; Quantificação de ADN; Teste de *Christmas Tree*; Teste do Antígeno Específico da Próstata





# Abstract

Sexual crimes are one of the most investigated crimes at the Forensic Genetics and Biology Service of the Centre Delegation of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, I.P., so is important to determine the presence of male genetic material, to prove the occurrence of the crime.

The preliminary orientation and certainty tests used at the Forensic Genetics and Biology Service for semen research, particularly the Prostate-Specific Antigen test and the Christmas Tree test, respectively, have shown a high forensic interest. However, the service has found that in several sexual examinations performed, no genetic profile of male origin and/or associated haplotype was determined despite the result of the preliminary orientation test being positive.

This study aimed to evaluate the laboratory workflow currently implemented in the Forensic Genetics and Biology Service for semen research, regarding the need to perform the preliminary tests in all samples that were received with an indication of research of biological material of male origin. To this end, 647 samples from sexual casework performed in the years 2020 and 2021 were evaluated.

It was found that only 39.6% of these samples contained significant male genetic profile and/or associated haplotype and as such would require preliminary testing. The amount of male DNA influenced the results of the preliminary tests for semen research and small amounts of DNA could prevent their positivity. If only the preliminary tests were performed on these samples, there would be a 60.4 % decrease in the cost and time spent performing the Prostate-Specific Antigen test, and a 47.2 % decrease in time spent on microscopic observation of the Christmas Tree test.

In turn, 60.4 % of the samples did not have a significant male genetic profile and/or associated haplotype, so there was no need to perform the preliminary tests. These samples contained mostly very little or no male genetic material.

**KEYWORDS:** Sexual assault; Semen research; DNA quantification; *Christmas Tree* test; Prostate-Specific Antigen test



# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vii
Índice de Figuras .....	xiii
Índice de Tabelas .....	xv
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Contextualização .....	1
1.2. Fluxo de trabalho laboratorial .....	2
1.2.1. Determinação da natureza do material biológico .....	2
1.2.1.1. Sangue .....	3
1.2.1.2. Saliva .....	4
1.2.1.3. Sêmen.....	6
1.2.2. Extração de ADN.....	10
1.2.3. Quantificação de ADN e Extração diferencial .....	11
1.2.4. Amplificação de ADN.....	13
1.2.5. Separação, deteção e análise do material amplificado. Valorização estatística .....	14
1.3. Amostras mais investigadas no âmbito de um crime sexual .....	16
1.3.1. Penso higiénico e fralda .....	16
1.3.2. Roupa da vítima .....	17
1.3.3. preservativos.....	17
1.3.4. Zaragatoas colhidas na vítima .....	18
2. Justificação e Objetivos .....	19
3. Materiais e Métodos .....	21
3.1. Avaliação de perícias de natureza sexual realizadas no SGBF-C nos anos de 2020 e 2021 .....	21

3.1.1.	Preparação das amostras a serem analisadas .....	21
3.1.2.	Avaliação da duração e custo médio da realização dos testes preliminares para pesquisa de sémen.....	24
3.2.	Metodologias laboratoriais utilizadas nas amostras das perícias sexuais avaliadas.....	25
3.2.1.	Testes preliminares para pesquisa de sémen.....	25
3.2.1.1.	Teste preliminar de orientação de PSA .....	25
3.2.1.2.	Teste preliminar de certeza <i>Christmas Tree</i> .....	26
3.2.2.	Trabalho laboratorial paralelo aos testes preliminares .....	27
3.2.2.1.	Extração das amostras .....	27
3.2.2.2.	Quantificação das amostras .....	27
3.2.2.3.	Amplificação de ADN e respetiva separação e análise do material amplificado.....	28
4.	Resultados e Discussão .....	31
4.1.	Determinação de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado.....	31
4.2.	Comparação da presença de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, a quantidade de ADN masculino existente e o resultado dos testes preliminares para pesquisa de sémen.....	33
4.2.1.	Relação entre a obtenção de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e a quantidade de ADN masculino existente.....	33
4.2.2.	Relação entre o resultado do teste preliminar de orientação de PSA e a quantidade de ADN masculino existente .....	35
4.2.3.	Relação entre o resultado do teste preliminar de certeza de <i>Christmas Tree</i> e a quantidade de ADN masculino existente.....	36
4.3.	Comparação da inexistência de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, a quantidade de ADN masculino existente e os testes preliminares para pesquisa de sémen .....	38
4.3.1.	Relação entre a inexistência de um perfil genético masculino e/ou haplótipo significativo e a quantidade de ADN masculino existente .....	38

**Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

4.3.2. Relação entre o resultado do teste preliminar de orientação de PSA e a quantidade de ADN masculino existente .....	40
4.4. Avaliação da duração e custo dos testes preliminares.....	44
5. Conclusões.....	49
6. Perspetivas futuras .....	53
7. Bibliografia.....	55



# Índice de Figuras

Figura 1: Número de amostras, expresso em percentagem, com e sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, provenientes das perícias sexuais realizadas no SGBF-C nos anos 2020 e 2021 ..... 32

Figura 2: Número de amostras, expresso em percentagem, com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e a respetiva quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e quantidade inferior a 0.01 ng/μL..... 33

Figura 3: Obtenção de um perfil genético e/ou haplótipo do cromossoma Y completo (azul) ou incompleto (laranja), de acordo com as diferentes quantidades de ADN masculino existentes: quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e quantidade inferior a 0.01 ng/μL..... 34

Figura 4: Número de amostras, expresso em percentagem, com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, que obtiveram um resultado positivo (azul) ou negativo (laranja) no teste de PSA, de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e quantidade inferior a 0.01 ng/μL..... 35

Figura 5: Número de amostras, expresso em percentagem, com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, que obtiveram um resultado positivo (azul) ou negativo (laranja) no teste preliminar de certeza para pesquisa de sémen CT, de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e quantidade inferior a 0.01 ng/μL..... 37

Figura 6: Número de amostras, expresso em percentagem, sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e respetiva quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL; quantidade inferior a 0.01 ng/μL e inexistência de ADN masculino..... 38

Figura 7: Número de amostras, expresso em percentagem, sem um perfil genético masculino associado e/ou haplótipo significativo, provenientes de vítimas do sexo masculino (azul) ou de amostras não processadas (laranja), com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL, à esquerda, e igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL, à direita ..... 39

Figura 8: Número de amostras, expresso em percentagem, sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, que obteve um resultado positivo (azul) ou negativo (laranja) no teste de PSA, de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL; quantidade inferior a 0.01 ng/μL e inexistência de ADN masculino ..... 40

Figura 9: Número de amostras, expresso em percentagem, pertencente a cada categoria de amostra sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e com um resultado positivo no teste de PSA, de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL (azul) e quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL (laranja) ..... 41

Figura 10: Tempo médio despendido, em horas, na realização do teste de PSA, de acordo com o fluxo de trabalho laboratorial atualmente implementado no SGBF-C (azul) e tempo médio necessário a despendar, se apenas se considerassem as amostras com necessidade (laranja) ..... 45

Figura 11: Tempo médio despendido, em minutos, na observação microscópica de CT positivas (azul) e de CT negativas (laranja)..... 46

Figura 12: Tempo médio despendido, em horas, na observação microscópica do teste de CT, de acordo com o fluxo de trabalho atualmente implementado no SGBF-C (azul) e o necessário a despendar, se apenas se considerassem as amostras com necessidade (laranja)..... 47



# Índice de Tabelas

Tabela 1: Designações consideradas para cada categoria organizada, referentes às perícias de natureza sexual realizadas nos anos 2020 e 2021, e respetiva quantidade existente .....	22
Tabela 2: Número de amostras das diversas categorias organizadas com um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e sem um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo .....	23



## Lista de Siglas e Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CT	<i>Christmas Tree</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DDT	<i>Ditiotreitol</i>
FA	Fosfatase Ácida
LIMS	<i>Laboratory Information Management System</i>
LR	<i>Likelihood Ratio</i>
ng/mL	Concentração em nanogramas por mililitro
ng/μL	Concentração em nanogramas por microlitro

Nm	Nanómetros
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSA	Antigénio Específico da Próstata
qPCR	<i>Real-time Quantitative PCR</i>
Rpm	Rotações por minuto
SAP	Polímeros superabsorventes
SGBF-C do INMLCF	Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i>
Y-STRs	<i>Short Tandem Repeats</i> do cromossoma Y

# 1. Introdução

## 1.1. Contextualização

A agressão sexual, um dos crimes mais praticados em todo o mundo, consiste em qualquer ato sexual ou a sua tentativa, como penetração ou toque de cariz sexual, sem o consentimento da vítima, maioritariamente do sexo feminino, utilizando a força, ameaça ou a sua incapacidade para resistir (Dworkin et al., 2017; Krug et al., 2002; Linden, 1999; McQueen et al., 2021).

De acordo com o Artigo 164º (Violação) do Código Penal, “(...) quem constranger outra pessoa a: praticar consigo ou com outrem cópula, coito anal ou coito oral; ou praticar atos de introdução vaginal, anal ou oral de partes do corpo ou objetos, é punido com pena de prisão de um a seis anos”, podendo ser punido de “(...) três a dez anos se praticar os referidos atos por meio de violência, ameaça grave, ou ter tornado a vítima inconsciente ou a ter posto na incapacidade de resistir (...)”.

Por sua vez, e de acordo com o Artigo 171º (Abuso Sexual de Crianças) do Código Penal, “(...) quem praticar ato sexual de relevo com ou em menor de 14 anos, ou o levar a praticá-lo com outra pessoa, é punido com pena de prisão de um a oito anos”, sendo que “(...) se esse ato sexual consistir em cópula, coito anal, coito oral ou introdução vaginal ou anal de partes do corpo ou objetos, o agente poderá ser punido com pena de prisão de três a dez anos (...)”.

Para a resolução deste tipo de crimes, há o envolvimento de diversas áreas médico-legais, nomeadamente da Clínica e Patologia Forenses, da Genética e Biologia Forenses e da Química e Toxicologia Forenses.

No entanto, a área de Genética e Biologia Forenses, responsável pela identificação das evidências biológicas para pesquisa de ADN e obtenção dos respetivos perfis genéticos, demonstra ter uma elevada importância, uma vez que permite estabelecer a identidade do agressor e as circunstâncias em que o crime ocorreu, bem como a sua relação com a vítima, com o local de crime e com os objetos utilizados na agressão (M. de F. Pinheiro, 2016; Porto, 2016).

Para tal, é importante determinar a possibilidade de estarem presentes manchas ou vestígios suspeitos em peças de vestuário, no corpo da vítima ou no local do crime, que possam confirmar o delito (M. de F. Pinheiro, 2016).

## **1.2. Fluxo de trabalho laboratorial**

No Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (SGBF-C do INMLCF), o percurso laboratorial de amostras relacionadas com um crime sexual inicia-se com a receção, observação dos diversos materiais e objetos relacionados com o delito e respetiva seleção das amostras-problema a analisar.

As amostras selecionadas são sujeitas a um registo fotográfico e a testes preliminares para determinação da natureza do material biológico presente nestas. As pesquisas de sémen, saliva e sangue são as mais realizadas neste tipo de crimes, podendo ser também pesquisados outros materiais biológicos, como pelos e células epiteliais (Cainé et al., 2008; M. de F. Pinheiro, 2016).

As células epiteliais podem ser encontradas a partir do agressor, através de células expelidas do pénis, saliva ou mãos e depositadas na vítima, através de um contacto com as partes do seu corpo (Fonneløp et al., 2019; Kenna et al., 2011), podendo também ser encontradas no trato reprodutor feminino (Wira et al., 2005). Atualmente, e tendo em consideração a evolução técnica, a determinação de perfis genéticos a partir deste tipo de células é cada vez mais solicitada, não sendo, no entanto, determinado, por rotina, no SGBF-C, este tipo de material biológico.

Paralelamente à pesquisa da natureza do material biológico, é realizada a extração, quantificação e amplificação do ADN presente nas amostras e respetiva análise. Posteriormente, é realizada uma comparação dos resultados obtidos com o perfil genético da vítima e do suspeito, isto é, com amostras de referência, de forma a determinar se há concordância entre si. Se aplicável, efetua-se uma valorização estatística dos resultados para elaborar um relatório pericial (Cainé et al., 2008; Magalhães et al., 2015; M. de F. Pinheiro, 2016; Sibille et al., 2002).

### **1.2.1. Determinação da natureza do material biológico**

Nas amostras-problema selecionadas, são realizados testes preliminares de orientação e de certeza para determinar a natureza do material biológico existente.

Os testes de orientação estabelecem a possibilidade de uma substância ou fluido corporal estar presente numa amostra. Não são consideradas uma prova de certeza, uma vez que existem diferentes materiais biológicos que podem positivar no teste

## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

realizado. São testes muito sensíveis, podendo haver um elevado risco de falsos positivos. Por sua vez, os testes de certeza conseguem identificar conclusivamente um material biológico específico, havendo um baixo risco de serem obtidos resultados falsos positivos (Burg et al., 2011; Butler, 2012d).

Todas as zaragatoas recebidas no SGBF-C em que é solicitada a pesquisa de sémen são atualmente sujeitas aos testes preliminares de orientação, sendo submetidas a testes de certeza, caso obtenham um resultado positivo.

As restantes amostras, nomeadamente roupa, pensos higiénicos, fraldas ou qualquer outro utensílio presumível de ter sido utilizado durante um crime sexual, são sujeitas a uma luz forense, de modo a identificar manchas suspeitas. No caso de estarem presentes, há emissão de fluorescência numa largura de banda de 420-470 nm. Contudo, diferentes materiais biológicos poderão emitir fluorescência, sendo por isso fulcral determinar a sua natureza (Kearse, 2020; Lynnerup et al., 1995).

Nos crimes sexuais, o sémen é a amostra biológica mais analisada, podendo encontrar-se presente em exsudados vaginais, anais ou bucais, em vestuário, no corpo da vítima ou em material utilizado, como preservativos ou pensos higiénicos (M. de F. Pinheiro, 2016).

É também importante investigar a presença de sangue, pela possibilidade de ter ocorrido alguma luta entre o agressor e a vítima, e de saliva, para verificar se houve lambidelas e/ou mordeduras por parte do agressor (Cainé et al., 2008).

### **1.2.1.1. Sangue**

Com o objetivo de verificar a possibilidade da existência de sangue numa determinada amostra, esta é sujeita a uma prova de orientação, que deve ser sensível, rápida, simples e segura (Cox, 1991). As provas de orientação para o sangue baseiam-se na deteção das moléculas de hemoglobina, presentes nos eritrócitos. Os diversos testes preliminares para o sangue poderão ter por base a luminescência, como é o caso do teste de luminol (Gross et al., 1999) e a cor, como o teste de Fenolftaleína ou teste de *Kastle-Mayer* (Cox, 1991).

O teste de luminol consiste na atividade de peroxidase da hemoglobina. Na presença de sangue, a amostra emite uma luminescência de cor azul (Barni et al., 2007; da Silva et al., 2012; Gross et al., 1999; Primorac, 2014). Contudo, estudos indicam que determinados produtos de limpeza, como a lixívia, poderão fornecer resultados falsos

positivos no teste de luminol, devido ao poder oxidante do hipoclorito presente nesta (Castelló et al., 2002).

Por sua vez, o teste de Fenolftaleína ou teste de *Kastle-Mayer*, permite identificar o grupo heme da hemoglobina, sendo que, na presença de peróxido de hidrogénio, a atividade de peroxidase da hemoglobina catalisa a reação de oxidação da fenolftalina, incolor, a fenolftaleína, que passa a cor rosa, confirmando a possibilidade de presença de sangue (Cox, 1991). No entanto, autores indicam que determinadas substâncias, como o tomate e a cebola vermelha, poderão reagir com o reagente utilizado neste teste, fornecendo um resultado falso positivo (Casali et al., 2020; Tobe et al., 2007).

Se uma mancha de sangue positivar no teste preliminar de orientação, é necessário realizar uma prova confirmatória, de modo a diminuir a possibilidade de existirem resultados falsos positivos. Poderão realizar-se diversos testes, nomeadamente o de *Teichmann*, o de *Takayama*, o de *RSID para sangue humano* e o *ABA card Hematrace* ou *SERATEC® HemDirect*.

O teste de *Teichmann* baseia-se na reação do grupo heme da hemoglobina com cloreto de sódio e ácido acético, formando cristais rômnicos de cloreto de hematina ou cloreto de ferriprotoporfina (Gaensslen, 1983; Verma, 2022).

Por sua vez, o teste de *Takayama* consiste na formação de cristais de hemocromogénio, devido à reação da piridina da hemoglobina (Gaensslen, 1983; Verma, 2022).

O teste *RSID para sangue humano* deteta a presença de glicoporfina A humana, presente nos glóbulos vermelhos (Turrina et al., 2008).

Por último, o teste *ABA card Hematrace* ou o teste *SERATEC® HemDirect*, método utilizado no SGBF-C, é um teste imunocromatográfico que deteta a presença de sangue, através da identificação de hemoglobina humana (Barbaro et al., 2015; Misencik et al., 2007). Contudo, autores indicam que o teste *SERATEC® HemDirect* pode ter uma reação cruzada com sangue de furão ou de primatas (Barbaro et al., 2015).

#### **1.2.1.2. Saliva**

Para determinar a possibilidade da presença de saliva, as amostras são sujeitas a uma prova de orientação. Uma vez que as manchas de saliva são dificilmente detetadas a olho nu, a utilização de luz forense é útil para detetar a sua presença. Contudo, nem sempre é fácil distinguir as manchas provenientes da saliva de outros



## Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual

fluidos, como o sêmen (Fiedler et al., 2008; Humphrey et al., 2001; Vandenberg et al., 2006; Wornes et al., 2018).

Por sua vez, o teste de *Phadebas* é um dos testes de orientação comumente utilizado para a determinação da possibilidade de presença de saliva, que consiste na deteção enzimática da enzima alfa-amilase. Na saliva humana, esta enzima catalisa a hidrólise de ligações alfa-glicosídicas no amido, glicogénio e oligossacarídeos. Os polímeros de amido insolúveis em água irão ligar-se a moléculas de corante azul, na presença da alfa-amilase (Wornes et al., 2018). No entanto, esta enzima poderá encontrar-se em outros fluidos corporais, como a urina, secreções vaginais ou sangue, e, como tal, poderá fornecer resultados falsos positivos (Vennemann et al., 2014; Wornes et al., 2018).

O teste utilizado no SGBF-C designa-se por *SERATEC® α-amilase*, teste imunocromatográfico que deteta a atividade enzimática da enzima alfa-amilase, presente na saliva. Como esta enzima poderá detetar-se em outros fluidos corporais, como mencionado anteriormente, o teste não é específico, podendo fornecer resultados falsos positivos (Barbaro et al., 2015).

Se uma amostra de saliva positivar num teste de orientação, é necessário realizar um teste de confirmação. Para tal, poderá realizar-se o teste *RSID™-Saliva*, teste imunocromatográfico que deteta a presença da enzima alfa-amilase salivar humana, através de dois anticorpos monoclonais anti-amilase salivar humana (Casey et al., 2010; J. B. Old et al., 2009). Apesar de alguns autores considerarem este teste como confirmatório, uma vez que consideram que não existe reação cruzada com outros fluidos de interesse forense (Casey et al., 2010), outros indicam que ele poderá positivar para outros fluidos corporais, como leite materno ou zangãos anais, podendo fornecer resultados falsos positivos (J. B. Old et al., 2009).

Relativamente à especificidade deste teste, a enzima alfa-amilase pode assumir duas formas, a *AMY1* e a *AMY2*, que se encontram em outros fluidos corporais, para além da saliva, como o sêmen, leite materno, fezes e urina. Assim, há uma redução significativa da identificação de saliva através deste teste. Adicionalmente, o teste *RSID™-Saliva*, apesar de ser considerado por alguns autores específico para a amilase da saliva humana, sofre uma reação cruzada com a amilase pancreática humana, devido à conformação homóloga dos dois tipos de amilase (Martin et al., 2006; Benjamin C. M. Pang et al., 2008).

### 1.2.1.3. Sémen

O sémen é a evidência que demonstra maior relevância num crime de caráter sexual, uma vez que é uma fonte de ADN excelente para determinar o perfil genético do agressor (Burg et al., 2011; Magalhães et al., 2015).

Para determinar a sua presença, é necessária a realização de testes preliminares orientativos, como o teste da Fosfatase Ácida (FA) e o Teste do Antígeno Específico da Próstata (PSA). A prova de orientação realizada pelo SGBF-C é o Teste de PSA.

A Fosfatase Ácida é uma enzima produzida pela próstata e secretada no fluido seminal, encontrando-se neste em elevadas concentrações (Lewis et al., 2013; Sensabaugh, 1978). Uma vez que a FA também se encontra presente noutros fluidos corporais, apesar de em baixas concentrações, como secreções vaginais, não é uma enzima específica para a presença de sémen (Harbison et al., 2016; Kind, 1957; McCloskey et al., 1975).

Na presença de fosfato de *ácido alfa-naftilo* e *Brentamina Fast Blue*, a FA produz uma cor roxa-escura. A tonalidade obtida depende da atividade da enzima, que poderá ser afetada negativamente pela idade da amostra e pelas condições de armazenamento (Allery et al., 2003; Lewis et al., 2013).

Por sua vez, o Antígeno Específico da Próstata é uma glicoproteína produzida pela glândula prostática e secretada no plasma seminal (Hochmeister et al., 1999). Esta glicoproteína é um marcador muito importante na deteção de sémen, sendo também passível de ser detetada em amostras de indivíduos azoospérmicos ou vasectomizados (Hochmeister et al., 1999; Sensabaugh, 1978).

No entanto, estudos revelam que a PSA não é uma glicoproteína específica da próstata. A PSA é dependente de esteroides, podendo ser detetada em outros tecidos e fluidos corporais, em baixas concentrações, como urina, saliva, secreções vaginais, fluido amniótico e leite materno (Breul et al., 1994; Diamandis et al., 1997; Rao et al., 2007; Schmidt et al., 2001; He Yu et al., 1995).

Uma pequena quantidade de PSA pode ser detetada em vítimas do sexo feminino, nomeadamente em secreções vaginais, uma vez que a síntese da glicoproteína pode ser induzida por hormonas esteroides, existentes em diversos tecidos da mulher. Uma vez que o ciclo menstrual é regulado por estradiol e progesterona, estudos indicam que a PSA se encontra presente, numa maior

## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

quantidade, durante a fase folicular média do referido ciclo (Nagar et al., 2013; Wahed et al., 2019).

Determinados autores indicam também que existe uma correlação entre os elevados níveis de PSA detetados na urina e na saliva de uma vítima do sexo feminino e a contraceção oral que realizam (Denison et al., 2004; Manello F. et al., 1998; H Yu et al., 1999, 1995). Para além disso, tecidos do trato urogenital também podem contribuir para um elevado nível de PSA na urina feminina (Manello F. et al., 1998; Seratec®, 2006).

Em vítimas do sexo masculino, os níveis de PSA tendem a aumentar com a idade, uma vez que a próstata se começa a desenvolver (Antoniou et al., 2004; Seratec®, 2006). Apesar disso, os níveis de PSA na urina são bastante menores, quando comparados com a quantidade de PSA existente no plasma seminal (Henky et al., 2011; Rao et al., 2007).

Estudos indicam ainda que alguns problemas de saúde, como carcinomas da próstata, hiperplasia benigna da próstata ou outras doenças urológicas, também podem interferir na quantidade de PSA presente na saliva e na urina, provocando a positividade do teste (Aksoy et al., 2002; Breul et al., 1994).

Como tal, o teste de PSA poderá fornecer resultados falsos positivos para a presença de sémen (Henky et al., 2011).

Um dos testes mais utilizados para a deteção da glicoproteína PSA é o *SERATEC® PSA Semiquant*, teste rápido imunocromatográfico com uma sensibilidade muito elevada. Este teste consiste na utilização de um sistema de anticorpos de duas camadas monoclonais anti-PSA humano. O primeiro anticorpo monoclonal móvel encontra-se conjugado com um corante. Este anticorpo liga-se ao antigénio PSA, migrando, de seguida, por atividade capilar, em direção a um segundo anticorpo monoclonal, que se encontra fixado numa zona de teste. O complexo formado anticorpo-antigénio-anticorpo possui partículas de corante concentradas, sendo facilmente visualizado (Barbaro et al., 2015; Denison et al., 2004; Laitan et al., 2011).

Estudos indicam que é normalmente garantido um resultado positivo para amostras com uma concentração de PSA igual ou superior a 2 ng/mL. Contudo, uma quantidade escassa de material genético de origem masculina poderá fornecer um resultado positivo fraco, ou até mesmo ausência de um resultado positivo (Barbaro et al., 2015). Para além disso, este teste não possui uma reatividade cruzada com outras proteínas constituintes do líquido seminal (Hochmeister et al., 1999), não existindo, atualmente, observações ou dados relativos a uma reatividade cruzada com o líquido

seminal de outros mamíferos ou primatas (Barbaro et al., 2015; Hochmeister et al., 1999; Miteva et al., 2006)

No teste de PSA, a amostra a ser analisada deve ser diluída, para evitar resultados falsos negativos. Tal deve-se ao efeito “*high dose hook effect*” (Barbaro et al., 2015; Denison et al., 2004). Como o teste de PSA é bastante sensível, consegue detetar a glicoproteína numa baixa concentração. A amostra, ao ser testada numa concentração elevada, poderá comprometer a formação do complexo antígeno-anticorpo-antígeno (Barbaro et al., 2015; Denison et al., 2004).

Para além disso, a diluição da amostra a ser analisada permite também a redução da probabilidade de obtenção de um resultado positivo nas amostras que não contêm líquido seminal, uma vez que a PSA se encontra presente em outros fluidos corporais (Barbaro et al., 2015; D. L. Laux et al., 2004; L. Laux et al., 2008).

Se o resultado do teste de orientação for positivo, é necessário haver uma confirmação da presença de sémen. Estudos indicam a existência de dois testes confirmatórios para tal, o teste de *Christmas Tree* (CT) e o teste *RSID<sup>TM</sup>-Sémen*, sendo o primeiro utilizado no SGBF-C.

A técnica de coloração de CT é uma prática microscópica que permite visualizar e confirmar a presença de espermatozoides numa dada amostra. Para tal, é utilizada a coloração *Nuclear Fast Red*, que cora as cabeças dos espermatozoides de vermelho e a coloração *Picro-Indigo-Carmine*, que cora as células epiteliais e os flagelos dos espermatozoides de verde. Os flagelos dos espermatozoides são mais suscetíveis a perderem-se durante a realização deste procedimento, sendo por isso necessário distinguir a coloração entre cabeças de espermatozoides e outro tipo de células, como as epiteliais (Allery et al., 2001).

O teste *RSID<sup>TM</sup>-Sémen* é uma técnica que permite identificar a semenogelina, proteína produzida pela vesícula seminal. Apesar de alguns autores considerarem esta proteína específica do sémen, afirmando este teste como confirmatório (Boward et al., 2013; Herr et al., 1986; J. Old et al., 2012; B C M Pang et al., 2007), estudos comprovam que a semenogelina também se encontra presente em outros tecidos corporais, como o músculo esquelético, rins, cólon, retina e em determinados carcinomas do pulmão, e, como tal, poderá fornecer resultados falsos positivos para a presença de sémen (Bonilha et al., 2006; Laitan et al., 2011; Lundwall et al., 2002).

Tal como mencionado, o SGBF-C utiliza, para fins de pesquisa de material biológico de origem masculina, uma lanterna forense para detetar manchas suspeitas de conterem sémen. Nestas amostras e nas zaragatoas colhidas no âmbito das

## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

agressões sexuais, é realizado o teste de PSA, nomeadamente o teste de *SERATEC® PSA Semiquant*. No caso de este teste ter um resultado positivo, as amostras prosseguem para a prova confirmatória de CT.

Várias características foram fulcrais para a escolha do teste de PSA como teste de orientação pelo SGBF-C. Diversos estudos evidenciaram a sua elevada especificidade, traduzida pela probabilidade reduzida de este fornecer resultados falsos positivos para a presença de sémen, comparativamente com outros testes, uma vez que os níveis de PSA em fluidos não prostáticos se encontram, normalmente, abaixo do limite de deteção (Laitan et al., 2011; Peonim et al., 2013). O tempo de permanência bastante significativo de PSA nas amostras de carácter sexual, relativamente a outras proteínas, nomeadamente a fosfatase ácida e a semenogelina, também foi fundamental para a preferência do método (Hobbs et al., 2010; Khaldi et al., 2004; Peonim et al., 2013).

Por sua vez, a observação microscópica de espermatozoides permite comprovar a presença de sémen, quando comparado com o teste *RSID™-Sémen*, que poderá fornecer resultados falsos positivos para a presença de sémen, pois a semenogelina poderá encontrar-se presente em diversos fluidos corporais distintos do sémen (Bonilha et al., 2006; Laitan et al., 2011; Lundwall et al., 2002). Por este motivo, o teste de CT foi selecionado pelo SGBF-C como teste preliminar de confirmação.

Todavia, é de salientar que a ausência de espermatozoides não é sinónimo de inexistência de crime sexual. Se ocorrer ejaculação fora da cavidade vaginal, como a bucal ou a anal, os espermatozoides poderão ser eliminados por enzimas salivares ou bacterianas, respetivamente (Hampton, 1995; Sibille et al., 2002). A recolha da amostra tardia, a penetração sem ejaculação, o facto de o perpetrador do crime ser azoospermico ou vasectomizado e a utilização de preservativo durante a prática sexual podem justificar a ausência de espermatozoides nas amostras a analisar (Cainé et al., 2008; Magalhães et al., 2015; Sibille et al., 2002). Também é de referir que existem falsas denúncias, que culminam numa colheita sem qualquer material biológico masculino de relevância.

### 1.2.2. Extração de ADN

No SGBF-C, é realizado um fluxo de trabalho laboratorial paralelamente aos testes preliminares e independentemente do resultado obtido nestes, de modo a ser possível comprovar a existência de um crime sexual.

Para tal, é necessário extrair o ADN de todas as amostras existentes, libertando-o do interior da célula, através de uma lise celular, e separando-o de outros constituintes presentes nas amostras, como inibidores e outros materiais celulares (Butler, 2012f).

Assim, é possível obter ADN em elevada qualidade nas amostras-problema analisadas, isto é, com a menor impureza possível e em quantidade suficiente para se obter um perfil genético, o qual poderá ser comparado com as amostras de referência (Applied Biosystems, 2008; Cainé et al., 2008; Magalhães et al., 2015; Pinheiro, 2016, Sibille et al., 2002).

De modo a selecionar a técnica de extração de ADN a utilizar, é necessário ter em conta determinados fatores, nomeadamente a quantidade de amostra existente, o tipo de material biológico presente, a existência de potenciais inibidores da amplificação e a rentabilidade do método a utilizar (Jakubowska et al., 2012; Stangegaard et al., 2013).

A técnica de extração de fase sólida é bastante utilizada na área forense, uma vez que é muito eficiente na remoção de inibidores da PCR, tendo um elevado nível de automação e rendimento (Altayari, 2016; Jakubowska et al., 2012).

O SGBF-C determinou que amostras-problema de sémen são extraídas através do *kit PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction*, que se baseia na libertação de ADN do material celular, na sua ligação a partículas magnéticas, designadas por esferas magnéticas, que se encontram incorporadas num polímero, na remoção de inibidores da amplificação, a realizar posteriormente, e na eluição do ADN purificado (Altayari, 2016).

Contudo, para além do ADN de interesse, pode ser extraído ADN não humano, como de fungos e bactérias. Assim, é importante garantir que o ADN a ser analisado é humano, e não de outra fonte, sendo necessário realizar uma quantificação específica para o mesmo (Butler, 2009).

### **1.2.3. Quantificação de ADN e Extração diferencial**

Posteriormente, procede-se à quantificação do ADN existente nas amostras sujeitas ao processo de extração. Tal como mencionado anteriormente, a quantificação é específica para ADN humano, uma vez que poderá estar presente ADN de outras fontes. O principal objetivo deste procedimento é verificar se existe material genético humano suficiente para amplificar na etapa seguinte. Assim, é possível obter resultados de melhor qualidade, preservando a amostra para análises posteriores (Martins et al., 2015).

O método utilizado atualmente no SGBF-C para quantificar o ADN existente em amostras relacionadas com crimes sexuais é o *Real-time Quantitative PCR* (qPCR), através do kit *Quantifiler® Trio DNA Quantification*. Este kit permite não só determinar a quantidade de ADN humano total e o ADN masculino numa reação única, como também verificar a qualidade de ADN amplificável, a presença de inibidores de PCR e a degradação do ADN (Butler, 2009; Swango et al., 2007).

Contudo, ao analisar-se a quantificação de amostras provenientes deste tipo de crimes, poderão ser detetadas proporções desequilibradas de células epiteliais e espermáticas, provenientes da vítima e do suspeito, respetivamente, havendo normalmente excesso de material genético da vítima, que mascara o componente masculino existente (Butler, 2009; Vuichard et al., 2011). Como tal, nestes casos, poderá ocorrer posteriormente uma amplificação preferencial do componente maioritário da mistura, neste caso da vítima, dificultando a deteção do componente minoritário, isto é, do suspeito do crime.

Com o objetivo de evitar esta ocorrência, determina-se, de acordo com a quantidade existente de material genético, o procedimento a realizar de seguida, ou seja, se é necessário ou não realizar uma extração diferencial, de modo a separar o componente feminino do masculino, e qual a amplificação a realizar, isto é, se se amplifica *Short Tandem Repeats* (STRs) autossómicos ou do cromossoma Y. Determina-se também a quantidade exata de ADN a utilizar na amplificação, de modo a otimizar este procedimento e selecionam-se quais as amostras que contêm ADN mais promissor de ser amplificado, de modo a ser possível estabelecer um perfil genético ou haplótipo completo (Butler, 2012b).

É importante determinar a quantidade exata de amostra a utilizar numa amplificação, pois uma amostra com excesso de material genético pode culminar na formação de um eletroferograma muito complexo e de difícil interpretação, bem como a

amplificação de uma amostra com uma escassa quantidade de material genético culmina numa perda de alelos (Butler, 2012b).

Todavia, se se determinar a necessidade de amplificar STRs do cromossoma Y (Y-STRs), é de notar que a informação genética resultante não é tão discriminativa como a de STRs autossómicos, uma vez que indivíduos do sexo masculino que pertençam a uma mesma linhagem partilham o mesmo haplótipo do cromossoma Y (Vuichard et al., 2011).

Por conseguinte, ao se detetar uma desproporção entre a quantidade feminina e masculina existente, poderá ser necessário realizar uma extração diferencial, que permite obter um perfil masculino autossómico, mais informativo. Esta extração realiza-se se a quantidade de material genético de origem masculina for elevada e se se detetar conteúdo espermático na prova preliminar de certeza (Vermeulen et al., 2009).

A extração diferencial, descrita em 1985 por Peter Gill, tem o intuito de isolar a fração masculina e feminina existentes, isto é, separar as células espermáticas das epiteliais, presentes numa mistura de ADN masculina e feminina (Gill et al., 1985; Horsman et al., 2005; Yoshida et al., 1995).

Inicialmente, é realizada uma primeira extração, utilizando apenas um tampão de extração, com o objetivo de lisar as células epiteliais, provenientes da vítima e menos resistentes à lise. De seguida, é realizada uma segunda extração, com tampão de extração e *Ditiotreitol* (DTT), que quebra as pontes de dissulfeto, constituintes das membranas nucleares espermáticas, mais resistentes, rompendo a sua membrana e permitindo recolher o ADN da fração espermática (Butler, 2012f; Vermeulen et al., 2009; Vuichard et al., 2011).

É também importante salientar que durante o processo, pode haver a impossibilidade de separar por completo as duas frações existentes, bem como ocorrer a perda de células espermáticas (Butler, 2012f; Cainé et al., 2008).

Porém, se o agressor for azoospermico ou vasectomizado, ou se a mistura existente for proveniente de diferentes indivíduos masculinos, não é possível a separação da fração masculina da feminina por este método (Butler, 2012f; Han et al., 2014; Ramos González et al., 2020). Nestes casos, apenas será viável a amplificação posterior de Y-STRs, que permite excluir possíveis suspeitos.



#### **1.2.4. Amplificação de ADN**

Se existir material genético suficiente, procede-se à amplificação da amostra pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), com o objetivo de se obter um elevado número de cópias de uma sequência de ADN de interesse (Bloch, 1991).

A PCR é um processo enzimático, descrito por Kary Mullis em 1985, que permite a amplificação de regiões específicas da amostra de ADN em múltiplas cópias, num período de tempo reduzido (Butler, 2012c).

Para a sua realização, é necessário: ADN da amostra; dois *primers*, marcados com fluorescência, que delimitam a zona de ADN de interesse a ser amplificada; dNTPs, que atribuem os nucleótidos necessários para completar a sequência de interesse à nova cadeia de ADN; magnésio, que ativa a atividade da ADN polimerase e *Taq polimerase*, responsável por adicionar os nucleótidos à nova cadeia cópia de ADN (Butler, 2012c).

O genoma eucariótico é constituído por sequências de ADN repetidas, sendo que apenas cerca de 0.3 % do genoma humano difere de indivíduo para indivíduo (Butler, 2010a). Essas sequências são normalmente designadas pelo comprimento da unidade de repetição contígua e do núcleo ou pelo comprimento total da região de repetição, designadas por regiões de satélite (Butler, 2010a). As regiões de satélite que possuam uma unidade de repetição entre 2 e 7 pares de base (pb) designam-se por microssatélites ou STRs. Uma vez que o número de repetições nos marcadores de STRs pode ser variável entre indivíduos, a sua amplificação é útil para a identificação humana (Butler, 2010a).

Existem diferentes tipos de marcadores de STRs relativamente ao seu tamanho de repetição, sendo que as repetições tetranucleotídicas, isto é, com quatro nucleotídeos na base de repetição, são as mais utilizadas para fins forenses (Butler, 2010a).

A amplificação de STRs autossómicos é executada na maioria das investigações de agressão sexual, podendo também realizar-se a amplificação de outros polimorfismos de ADN, como Y-STRs, uma vez que a maioria dos crimes sexuais é consumado por indivíduos do sexo masculino (Cainé et al., 2008; Pinheiro, 2016).

De modo a ser possível amplificar STRs autossómicos, o SGBF-C utiliza o *kit GlobalFiler™ PCR Amplification*, enquanto para amplificar STRs do cromossoma Y, utiliza o *kit YFiler® Plus PCR Amplification*.

### 1.2.5. Separação, detecção e análise do material amplificado. Valorização estatística

Os STRs autossômicos e/ou do cromossoma Y amplificados na etapa anterior são separados com base no seu tamanho, por eletroforese capilar, utilizando um sequenciador automático, que permite detetar a fluorescência emitida pela amostra (Butler, 2012e).

O resultado obtido é convertido num eletroferograma, uma representação gráfica dos alelos presentes na amostra de ADN, que se traduz num perfil genético masculino e/ou haplótipo do cromossoma Y.

Ao serem analisados, poderá determinar-se a presença de um perfil genético e/ou haplótipo singular ou de mistura. O perfil genético ou haplótipo obtidos poderão ser classificados em: completos, quando são obtidos resultados em todos os polimorfismos analisados; incompletos, quando só existem resultados em alguns polimorfismos analisados; ou não valorizáveis (P. Gill et al., 2006; Luque, 2012).

Posteriormente, o perfil genético ou haplótipo problema são comparados com amostras de referência, isto é, da vítima e do/s suspeito/s, sendo que os perfis genéticos ou haplótipos do cromossoma Y singulares podem ser classificados como coincidentes ou distintos da amostra de referência e as misturas de perfis genéticos ou de haplótipos do cromossoma Y como compatíveis ou não compatíveis com as amostras de referência. Em casos de misturas complexas, poderá determinar-se que o resultado obtido é inconclusivo (P. Gill et al., 2006; Luque, 2012).

No caso de os perfis genéticos obtidos serem coincidentes ou compatíveis com as amostras de referência, poderá ser necessária a valorização estatística respetiva, através do cálculo da razão de verosimilhança ou *Likelihood Ratio* (LR), sendo que para os polimorfismos do cromossoma Y não é realizada, normalmente, a sua valorização estatística (Butler, 2010b; Cowen et al., 2008; M. de F. Pinheiro, 2016). Esta razão é traduzida pela seguinte equação.

$$LR = \frac{\text{Probabilidade da amostra biológica provir do suspeito}}{\text{Probabilidade da amostra biológica provir de outro indivíduo que não aquele}}$$

O valor de LR obtido indica “quantas vezes é mais provável que seja observada a informação genética obtida, assumindo que a amostra pertence ao suspeito, comparada com a possibilidade de não pertencer” (Pinheiro, 2016).

## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

É ainda importante realçar que aspetos como a recolha tardia de amostras biológicas, o seu mau acondicionamento, a utilização de preservativo durante a prática sexual ou a condição do sistema reprodutor do agressor são exemplos que poderão justificar a ausência de um perfil genético e/ou haplótipo e consequentemente, provocar a impossibilidade de qualquer comparação com o perfil genético e/ou haplótipo do suspeito (Cainé et al., 2008).

Na presença de uma mistura de perfis genéticos, ao analisar-se a amplificação de STRs autossómicos, apenas são detetados componentes minoritários que contribuam mais de 5 % para essa mistura (Parson et al., 2001). Uma vez que o componente masculino do agressor se encontra, normalmente, numa proporção muito baixa em comparação com o ADN da vítima, aquele pode ficar mascarado por este. Consequentemente, a interpretação da contribuição masculina de STRs autossómicos pode tornar-se impossível ou muito complexa (Cainé et al., 2008; Parson et al., 2001). Nestes casos, é possível realizar uma extração diferencial, como explicado anteriormente, ou analisar STRs do cromossoma Y.

No caso de não ser possível realizar uma extração diferencial, a análise de Y-STRs tem um elevado interesse forense, uma vez que é possível analisar apenas a fração masculina existente, eliminando a fração feminina, pois os *primers* utilizados nesta amplificação são específicos para o sexo masculino (Cainé et al., 2008; Jobling et al., 1997; Pinheiro, 2010), identificando marcadores que apenas se encontram presentes neste género, na sua fração não recombinante (Cainé et al., 2008; Jobling et al., 1997).

A análise de Y-STRs possibilita também a determinação da quantidade de contribuintes masculinos existentes na mistura presente (M Prinz et al., 2001; Mechthild Prinz et al., 2001; Purps et al., 2015).

Contudo, todos os parentes de uma linhagem paterna possuem o mesmo ADN do cromossoma Y, pois este é transferido diretamente de pai para filho, sem qualquer tipo de recombinação, e, como tal, não existe variabilidade do ADN do cromossoma Y na mesma linhagem (Butler, 2012a). Assim, a análise de Y-STRs não permite identificar o agressor, mas sim afirmar que um dado indivíduo de uma determinada linhagem poderá ter contribuído para o resultado obtido, ou seja, permite excluir possíveis suspeitos (Cainé et al., 2008; Kayser, 2017; Roewer, 2009).

Por esse motivo, a análise de STRs autossómicos, transferidos pelos dois progenitores para a sua descendência, tem um maior valor probatório

comparativamente com os Y-STRs, pois tem um poder de discriminação superior (Butler, 2010c).

### **1.3. Amostras mais investigadas no âmbito de um crime sexual**

As amostras de fluidos biológicos relevantes têm um elevado interesse forense, pois, tal como mencionado anteriormente, poderão permitir caracterizar o perfil genético e/ou haplótipo do agressor, comparando-o posteriormente com o perfil genético e/ou haplótipo do suspeito.

Normalmente, após um crime sexual, são recolhidas zaragatoas do corpo da vítima, nomeadamente dos genitais externos e vaginais, que permitam colher fluidos corporais de interesse. O vestuário, acessórios ou utensílios utilizados durante a agressão sexual, como roupa interior, roupa de cama ou toalhas, são também analisados (Boland et al., 2007; Martínez et al., 2015; Ruiz, 2020).

Materiais como pensos higiénicos, fraldas, preservativos, roupas utilizadas durante e após o crime sexual, e zaragatoas recolhidas após o delito são exemplos das evidências mais analisadas neste tipo de casos (Martínez et al., 2015).

#### **1.3.1. Penso higiénico e fralda**

Os pensos higiénicos e fraldas utilizados durante e após um crime sexual, até um período de 72 horas, devem ser analisados, uma vez que, se se confirmar o delito, o conteúdo espermático tende a ser absorvido por estes e, como tal, irá incluir um elevado conteúdo do material genético do agressor (Elliott et al., 2003; Ruiz, 2020).

Os pensos higiénicos, fraldas e objetos idênticos são constituídos por diferentes camadas, com diversas composições. De acordo com a literatura, a primeira camada, porosa, é constituída por polipropileno hidrofóbico e polietileno, enquanto a camada inferior, mais absorvente, é constituída por celulose e sais de sódio poliacrílico (Ajmeri et al., 2010; Ruiz, 2020; Zohuriaan-Mehr et al., 2008).

Os sais de sódio poliacrílico, presentes na camada inferior, são considerados polímeros hidrofílicos, designados por polímeros superabsorventes (SAP) (Ruiz, 2020). Estes polímeros tendem a absorver uma quantidade superior de fluidos, em comparação

## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

com a outra camada. Consequentemente, os fluidos corporais tendem a ser absorvidos pelos SAP, formando um hidrogel (Ganji et al., 2010; Ruiz, 2020; Zohuriaan-Mehr et al., 2008).

Uma vez que os pensos higiênicos e fraldas, comumente utilizados pelas vítimas, se encontram em contacto com as suas partes íntimas, tendo a capacidade de reter os fluidos corporais e manter a sua integridade, são considerados uma evidência muito importante para a genética forense (Harbison et al., 2016).

Devido à sua composição, os fluidos biológicos são repelidos pelas camadas superiores dos pensos higiênicos, hidrofóbicas, para a camada inferior (Camarena et al., 2017; Gregório et al., 2019).

### **1.3.2. Roupas da vítima**

Na maioria dos crimes sexuais, a roupa da vítima continua a ser uma evidência muito importante.

Após um crime sexual, a vítima tende, por vezes, a armazenar a roupa utilizada, impossibilitando a investigação das evidências biológicas presentes nestas. De acordo com a literatura, uma pequena percentagem de perpetradores de um crime sexual utiliza preservativos, apesar dos inúmeros riscos existentes para a saúde (Brayley-Morris et al., 2015; Chambers et al., 2010). Consequentemente, poderão ejacular fora da cavidade vaginal, podendo utilizar as roupas da vítima, deixando manchas visíveis de sémen, que poderão permanecer detetáveis durante muito tempo (Brayley-Morris et al., 2015; Karadayi et al., 2020). Como tal, estas amostras tendem a fornecer resultados confiáveis, quando avaliados pelo teste de orientação *SERATEC® Semiquant PSA* (Karadayi et al., 2020).

Contudo, é de notar que roupas que possuam poliéster não fornecem resultados promissores nos testes de PSA (Karadayi et al., 2020).

### **1.3.3. Preservativos**

Tal como já mencionado anteriormente, a presença de sémen é a evidência mais significativa da ocorrência de um crime sexual.

Contudo, nem sempre é detetado ADN masculino nas zaragatoas colhidas à vítima, sendo a utilização do preservativo uma das possíveis explicações para tal efeito (Burnier et al., 2021), uma vez que os perpetradores dos crimes poderão evitar a

transferência de fluidos corporais com a vítima, de modo a mascarar o crime cometido (Kapgate et al., 2019).

Por esse motivo, o preservativo é uma das evidências mais promissoras de conter material genético do suspeito e da vítima.

No entanto, estudos indicam que preservativos que contenham lubrificante poderão fornecer resultados falsos positivos no teste de PSA, sendo esse o motivo pelo qual não se consiga confirmar a presença de material genético de origem masculina no teste preliminar de certeza realizado posteriormente (Bitner, 2012).

#### **1.3.4. Zaragatoas colhidas na vítima**

Num crime sexual, as zaragatoas colhidas na vítima são uma importante evidência da ocorrência deste tipo de ataques, uma vez que a maioria destes envolve penetração vaginal, oral, digital e/ou anal.

A detecção de espermatozoides nas zaragatoas orais, retais ou vaginais recolhidas à vítima raramente é possível após 6, 24 ou 48 horas após o crime sexual, respetivamente (Astrup et al., 2012; Barbaro et al., 2015; Casey et al., 2017; Laitan et al., 2011).

O tempo de permanência dos espermatozoides na cavidade vaginal e a sua detecção depende também de: idade da vítima; circunstância em que o crime ocorreu, ou seja, se se utilizou ou não preservativo, não ter ocorrido ejaculação, ou o perpetrador do crime ser vasectomizado ou azoospermico; o tempo decorrido entre a colheita da amostra e a ocorrência do crime e as atividades que a vítima praticou após o crime, isto é, se urinou, defecou, comeu ou tomou banho (Barbaro et al., 2015; Owers et al., 2018).

Estudos indicam que nas situações em que não é detetado sémen nas zaragatoas recolhidas, não é frequentemente realizada a análise de ADN autossómico, pois a expectativa de encontrar ADN masculino é muito reduzida, devido aos elevados níveis de ADN feminino presente, que mascara o componente masculino (Owers et al., 2018). Nestes casos, a análise de STRs do Cromossoma Y é muito valiosa (McDonald et al., 2015; Owers et al., 2018).

Contudo, é importante salientar que o teste de PSA é influenciado pelo pH da amostra, sendo que baixos níveis de pH, como o pH de secreções vaginais, poderão fornecer resultados falsos positivos (Barbaro et al., 2015).

## 2. Justificação e Objetivos

O sémen é a evidência mais significativa nas perícias de caráter sexual. Contudo, aspetos como a colheita tardia ou incorreto acondicionamento de amostras biológicas, utilização de preservativo durante a prática sexual, a não ocorrência de ejaculação, ou até mesmo anomalias no sistema reprodutor do agressor poderão proporcionar uma escassa quantidade de material genético de origem masculina a analisar.

A quantidade insuficiente ou até mesmo nula de material genético masculino pode não só impossibilitar a confirmação da presença de sémen, através de testes preliminares, como também inviabilizar a identificação de um perfil genético.

Para além disso, o SGBF-C detetou que em várias situações em que era obtido um resultado positivo para o teste preliminar de orientação de PSA não era determinado qualquer perfil genético de origem masculina associado. Como tal, revelou-se importante realizar um estudo mais aprofundado destes casos.

Assim, o principal objetivo deste trabalho será avaliar o fluxo de trabalho laboratorial atualmente implementado no SGBF-C para a pesquisa de sémen, nomeadamente em relação à necessidade de realização de testes preliminares em todas as amostras que são recebidas com indicação de pesquisa de material biológico de origem masculina.





## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1. Avaliação de perícias de natureza sexual realizadas no SGBF-C nos anos de 2020 e 2021**

#### **3.1.1. Preparação das amostras a serem analisadas**

Com o objetivo de avaliar o fluxo de trabalho laboratorial atualmente implementado no SGBF-C para a pesquisa de sémen, foi efetuada uma avaliação dos resultados obtidos nas perícias de natureza sexual realizadas no SGBF-C ao longo dos anos 2020 e 2021, nomeadamente nas metodologias de quantificação e determinação da natureza do material biológico das diversas amostras existentes.

Foram analisadas 149 perícias, que se encontravam concluídas, não tendo havido qualquer identificação pessoal dos intervenientes, culminando num total de 650 amostras, devidamente anonimizadas, sendo que 593 eram provenientes de vítimas do sexo feminino e 57 provenientes de vítimas do sexo masculino.

Inicialmente, realizou-se um tratamento de dados das diversas amostras existentes para a pesquisa de sémen, uma vez que se verificou que existiam amostras colhidas em locais similares ou que continham diferentes designações, atribuídas pelos peritos que realizaram a sua colheita. Para tal, estas foram organizadas nas seguintes categorias: Espéculo, Lençóis, Penso higiénico, Roupa interior, Vestuário, Zaragatoa anal externa, Zaragatoa anal interna, Zaragatoa oral, Zaragatoa peniana, Zaragatoa da superfície corporal, Zaragatoa vaginal externa e Zaragatoa vaginal interna.

Na Tabela 1, encontram-se discriminadas as diferentes designações consideradas para cada categoria organizada e a respetiva quantidade existente.

Tabela 1: Designações consideradas para cada categoria organizada, referentes às perícias de natureza sexual realizadas nos anos 2020 e 2021, e respetiva quantidade existente

<b>Categorias de amostras</b>	<b>Tipo de amostras</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Espéculo</b>	Espéculo	6
<b>Lençóis</b>	Toalha, pano, manta, roupa de cama/lençóis	75
<b>Penso higiénico</b>	Copo menstrual, penso higiénico, tampão, fralda, toalhete	36
<b>Roupa interior</b>	Cuecas, soutien	111
<b>Vestuário</b>	Blusão, body, calças, camisa, camisola, leggings, meias-calças, top	103
<b>Zaragatoa anal externa</b>	Zaragatoa peri-anal	28
<b>Zaragatoa anal interna</b>	Zaragatoa anal, zaragatoa anorretal, zaragatoa intra-anal, zaragatoa retal	50
<b>Zaragatoa oral</b>	Zaragatoa bucal, zaragatoa oral	10
<b>Zaragatoa peniana</b>	Zaragatoa peniana	1
<b>Zaragatoa da superfície corporal</b>	Zaragatoa abdominal, zaragatoa cervical, zaragatoa da coxa, zaragatoa mamária, zaragatoa subungueal, zaragatoa do umbigo	30
<b>Zaragatoa vaginal externa</b>	Zaragatoa colheita externa, zaragatoa vestibular, zaragatoa dos grandes lábios, zaragatoa dos pequenos lábios, zaragatoa perivulvar, zaragatoa vulvar	71
<b>Zaragatoa vaginal interna</b>	Zaragatoa colheita interna, zaragatoa do colo do útero, zaragatoa do exsudado vaginal, zaragatoa do fundo do saco, zaragatoa do introito, zaragatoa intravaginal, zaragatoa vaginal	129

De modo a verificar a concordância dos resultados obtidos nas perícias sexuais mencionadas, compararam-se os resultados finais destas, isto é, a obtenção ou não de um perfil genético masculino e/ou haplótipo significativo com a quantidade de ADN masculino existente e também com o resultado obtido nos testes preliminares efetuados para a pesquisa de sémen.

## Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual

Para tal, as categorias organizadas foram inicialmente divididas em dois subgrupos, nomeadamente “Amostras com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo” e “Amostras sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo”. No primeiro grupo, consideraram-se as amostras que tiveram relevância para a identificação do agressor, independentemente do perfil genético e/ou haplótipo obtido ter sido singular ou de mistura. Por sua vez, o último grupo correspondeu a amostras não processadas, que tiveram associado um perfil genético proveniente da vítima, ou àquelas em que foi determinado um perfil genético não valorizável.

Na Tabela 2, e de acordo com as categorias organizadas, encontra-se representado o número de amostras que obtiveram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e que não obtiveram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo.

*Tabela 2: Número de amostras das diversas categorias organizadas com um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e sem um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo*

<b>Categorias de amostras</b>	<b>Número de amostras com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo</b>	<b>Número de amostras sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo</b>
<b>Espéculo</b>	1	5
<b>Lençóis</b>	35	40
<b>Penso higiénico</b>	1	35
<b>Roupa interior</b>	64	47
<b>Vestuário</b>	59	44
<b>Zaragatoa anal externa</b>	10	18
<b>Zaragatoa anal interna</b>	7	43
<b>Zaragatoa oral</b>	0	10
<b>Zaragatoa peniana</b>	1	0
<b>Zaragatoa da superfície corporal</b>	13	17
<b>Zaragatoa vaginal externa</b>	25	46
<b>Zaragatoa vaginal interna</b>	43	86

Após a análise das categorias do primeiro subgrupo considerado, verificou-se que a categoria “Zaragatoa oral” não continha qualquer amostra e que as categorias “Espéculo”, “Penso Higiénico” e “Zaragatoa peniana” possuíam apenas uma. Como tal, estas categorias não foram alvo de qualquer análise posterior a realizar, uma vez que não tinham representatividade na amostragem.

Por sua vez, ao analisar as categorias que não continham um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, verificou-se que a categoria “Zaragatoa peniana” não possuía qualquer amostra, pelo que também não foi sujeita a análise posterior.

Como tal, foram contabilizadas apenas 647 amostras.

Posteriormente, as amostras dos subgrupos mencionados foram organizadas de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: uma quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; uma quantidade igual ou superior a 0.01 e inferior a 0.1 ng/μL; uma quantidade inferior a 0.01 ng/μL ou inexistência de ADN masculino.

No subgrupo “Amostras com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo”, vários parâmetros foram avaliados, nomeadamente: relação existente entre a quantidade de ADN masculino e a obtenção de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado completo ou incompleto e a relação entre a quantidade de material genético masculino e os resultados obtidos nos testes preliminares para a pesquisa de sémen.

No subgrupo “Amostras sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo”, analisou-se a relação existente entre a quantidade de ADN masculino e as amostras não processadas ou provenientes de vítimas do sexo masculino. Avaliou-se também a influência da quantidade de material genético masculino existente e o resultado obtido no teste preliminar de PSA, analisando-se, igualmente, os diversos tipos de amostras que obtiveram um resultado positivo no teste.

### **3.1.2. Avaliação da duração e custo médio da realização dos testes preliminares para pesquisa de sémen**

Procedeu-se ainda a uma avaliação do tempo médio necessário para a realização dos testes preliminares executados no SGBF-C para a pesquisa de sémen, nomeadamente na obtenção de resultados. Para tal, foi necessário cronometraram-se os testes do Antígeno Específico da Próstata (PSA) e de *Christmas Tree* (CT) realizados em perícias de natureza sexual no SGBF-C ao longo dos anos de 2021 e 2022, uma vez que o estudo efetuado foi retrospectivo, não tendo sido efetuada qualquer avaliação relativamente a este parâmetro nos testes preliminares realizados nas perícias dos anos 2020 e 2021.

## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

Cronometraram-se 40 amostras sujeitas ao teste de PSA e ao teste de CT. Relativamente ao teste de PSA, uma vez que o tempo médio necessário para a obtenção de resultados, independentemente de ser positivo ou negativo, era comum para todas as amostras, considerou-se, para além do tempo médio de realização do teste, todo o procedimento a executar antes, isto é, a procura e recolha das amostras do local onde se encontravam armazenadas, como também todo o procedimento a realizar posteriormente, ou seja, o tempo despendido na inserção dos resultados no *software LIMS* do SGBF-C.

Por sua vez, em relação ao teste de CT, o tempo médio de preparação das lâminas para visualizar ao microscópio era comum para todas as amostras, sendo que apenas o tempo médio de visualização, de acordo com a obtenção de um resultado positivo ou negativo, era diferente. Como tal, para esta avaliação, considerou-se apenas o tempo médio despendido na observação microscópica.

Para além desta análise, considerou-se também a despesa monetária dos testes de PSA, não se avaliando o custo despendido no de CT, uma vez que os reagentes utilizados podem ser aproveitados para um grande número de amostras, não sendo significativo o custo de cada um destes testes.

### **3.2. Metodologias laboratoriais utilizadas nas amostras das perícias sexuais avaliadas**

#### **3.2.1. Testes preliminares para pesquisa de sémen**

##### **3.2.1.1. Teste preliminar de orientação de PSA**

O teste *SERATEC*® *PSA Semiquant* é considerado um teste preliminar de orientação imunocromatográfico para deteção da glicoproteína PSA. É considerado um teste semiquantitativo, pelo que, tal como mencionado pelo fabricante, apresenta uma linha de controlo interno com uma intensidade reflexa de uma concentração de PSA de 4 ng/mL.

Inicialmente, foi retirado um pequeno fragmento das amostras selecionadas, suspeitas de conterem manchas de sémen, e colocado num *ependorf*. Foi também

preparado um controlo positivo, feito com uma mancha de sémen conhecida, bem como um controlo negativo.

Foram adicionados 200 µL de tampão (8.0 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.1 mL 10 wt% NaN<sub>3</sub>; pH 7.4), fornecido pelo *kit*, e de seguida, as amostras foram incubadas durante 2 horas, a 400 rotações por minuto (rpm) a 24 °C.

Retirou-se uma cassete do invólucro, identificando-se a amostra. Após as 2 horas, adicionaram-se 120 µL do produto de extração (cerca de 3 gotas) ao poço da cassete. Leu-se o resultado do teste após 10 minutos, à temperatura ambiente. Este resultado pode ser positivo, negativo ou inválido.

Num resultado positivo, foram observadas três bandas na janela de resultados do teste, correspondentes a uma banda controlo, a uma banda de *standart* interno e a uma banda de teste.

Num resultado negativo, foram observadas apenas a banda de controlo e de *standart* interno.

Os testes foram considerados inválidos se não apresentaram qualquer tipo de banda de controlo ou de *standart* interno.

Por fim, realizou-se o registo fotográfico do resultado obtido, o qual ficou registado no *software LIMS* do SGBF-C.

As amostras que positivaram no teste de PSA foram sujeitas ao teste preliminar de certeza de *Christmas Tree*.

### **3.2.1.2. Teste preliminar de certeza *Christmas Tree***

O método de *Christmas Tree* é uma técnica microscópica que consiste na coloração dos espermatozoides, se existentes, de verde, através da ação do corante *Picro-Indigo-Carmin*, e dos núcleos celulares de vermelho, por ação do corante *Nuclear Fast Red*.

Inicialmente, as amostras que testaram positivo no teste de PSA foram centrifugadas a 9000 rpm durante 3 minutos.

De seguida, pipetaram-se 20 µL de sedimento para uma lâmina de microscopia, que se encontrava devidamente identificada.

Fixou-se a amostra à lâmina, com recurso a uma fonte de calor, até se verificar que aquela ficou completamente seca.

## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

Colocou-se a lâmina numa câmara húmida, cobrindo-se a amostra com a solução *Nuclear Fast Red* e aguardou-se 15 minutos. Ao fim deste período de tempo, lavou-se cuidadosamente com água destilada.

Cobriu-se a amostra com a solução *Picro-Indigo-Carmin*, aguardando-se 15 a 30 segundos. De seguida, lavou-se com Etanol a 90%, deixando secar ao ar.

Depois de seco, montou-se a lamela com uma gota de *Entellan*.

Visualizou-se ao microscópio ótico, com uma objetiva de 40x, efetuando um registo fotográfico das amostras positivas.

Inseriu-se o resultado obtido no Registo de Provas e no *software LIMS* do SGBF-C.

### **3.2.2. Trabalho laboratorial paralelo aos testes preliminares**

Paralelamente aos testes preliminares, foi realizada a extração, quantificação e amplificação das amostras das perícias sexuais realizadas no SGBF-C nos anos 2020 e 2021.

#### **3.2.2.1. Extração das amostras**

A extração das amostras das perícias sexuais utilizaram o kit *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction*, através do equipamento *Automate Express™ Forensic DNA Extraction System*, do fabricante *Applied Biosystems*®.

#### **3.2.2.2. Quantificação das amostras**

Para a quantificação dessas amostras, foi utilizado o kit *Quantifiler® Trio DNA Quantification* e o equipamento *7500 Real-Time PCR System*, do fabricante *Applied Biosystems*®.

Como mencionado anteriormente, os resultados obtidos na quantificação destas amostras foram posteriormente divididos em grupos, nomeadamente, com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL, igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL, inferior a 0.01 ng/μL e inexistência de ADN masculino.

### **3.2.2.3. Amplificação de ADN e respetiva separação e análise do material amplificado**

De seguida, amplificaram-se os STRs autossómicos e/ou do cromossoma Y das amostras, tendo em consideração os resultados da quantificação. O resultado obtido foi convertido num eletroferograma, que se traduziu num perfil genético ou haplótipo singular ou de mistura.

O perfil genético ou haplótipo obtidos puderam ser classificados em: completos, se obtiveram resultados em todos os polimorfismos analisados; incompletos, se obtiveram resultados em apenas alguns polimorfismos ou não valorizáveis.

Para além disso, os perfis genéticos problema foram comparados com amostras de referência, isto é, provenientes da vítima e/ou do suspeito. No caso de obtenção de um perfil genético ou haplótipo do cromossoma Y singular, o perfil genético ou haplótipo problema foram classificados em coincidentes ou distintos das amostras de referência. Por sua vez, no caso de obtenção de uma mistura de perfis genéticos ou de haplótipos do cromossoma Y, o perfil genético ou haplótipo problema foram classificados em compatíveis ou não compatíveis com as amostras de referência.

No caso do perfil genético ou haplótipo problema ter sido coincidente ou compatível com a amostra de referência do agressor, considerou-se que se obteve um perfil genético masculino e/ou haplótipo significativo, ou seja, o perfil genético e/ou haplótipo obtidos tiveram relevância para identificar o agressor do crime, independentemente de serem singulares ou de mistura.

Neste tipo de crimes, o componente masculino do agressor encontra-se, normalmente, numa proporção muito baixa, quando comparado com o ADN da vítima, que pode mascarar o componente minoritário. Uma vez que numa mistura de perfis genéticos, ao analisar-se a amplificação de STRs autossómicos, apenas são detetados componentes minoritários que contribuam mais de 5 % para essa mistura, é importante, nestes casos, a amplificação de STRs do cromossoma Y, que permite a eliminação da fração feminina, bem como a determinação da quantidade de contribuintes masculinos para a mistura.

A amplificação de STRs autossómicos realizou-se com o *kit GlobalFiler™ PCR Amplification*, para determinar perfis de ADN nos *loci* *D3S1358*, *vWA*, *D16S539*, *CSF1PO*, *TPOX*, *Y indel*, *Amelogenina*, *D8S1179*, *D21S11*, *D18S51*, *DYS391*, *D2S441*, *D19S433*, *TH01*, *FGA*, *D22S1045*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820*, *SE33*, *D10S1248*, *D1S1656*, *D12S391* e *D2S1338*. O sistema utilizou ainda 6 fluorocromos,



## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

nomeadamente o 6-FAM<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup>, TAZ<sup>TM</sup>, SID<sup>TM</sup> e LIZ<sup>TM</sup>, que permitiram a deteção automática de fragmentos de ADN.

A amplificação de STRs do cromossoma Y realizou-se com o *kit YFiler® Plus PCR Amplification*, para determinar perfis de ADN nos *loci* DYS576, DYS3891, DYS635, DYS389II, DYS627, DYS460, DYS458, DYS19, YGATAH4, DYS448, DYS391, DYS456, DYS390, DYS438, DYS392, DYS518, DYS570, DYS437, DYS385, DYS449, DYS393, DYS439, DYS481, DYF387S1 e DYS533. O sistema utilizou ainda um sistema de 6 fluorocromos, nomeadamente o 6-FAM<sup>TM</sup>, VIC<sup>®</sup>, NED<sup>TM</sup>, TAZ<sup>TM</sup>, SID<sup>TM</sup> e LIZ<sup>TM</sup>, que permitiram a deteção automática de fragmentos de ADN.

Para as duas amplificações, utilizou-se o equipamento *3500 Genetic Analyzer*, do fabricante *Applied Biosystems* ®.



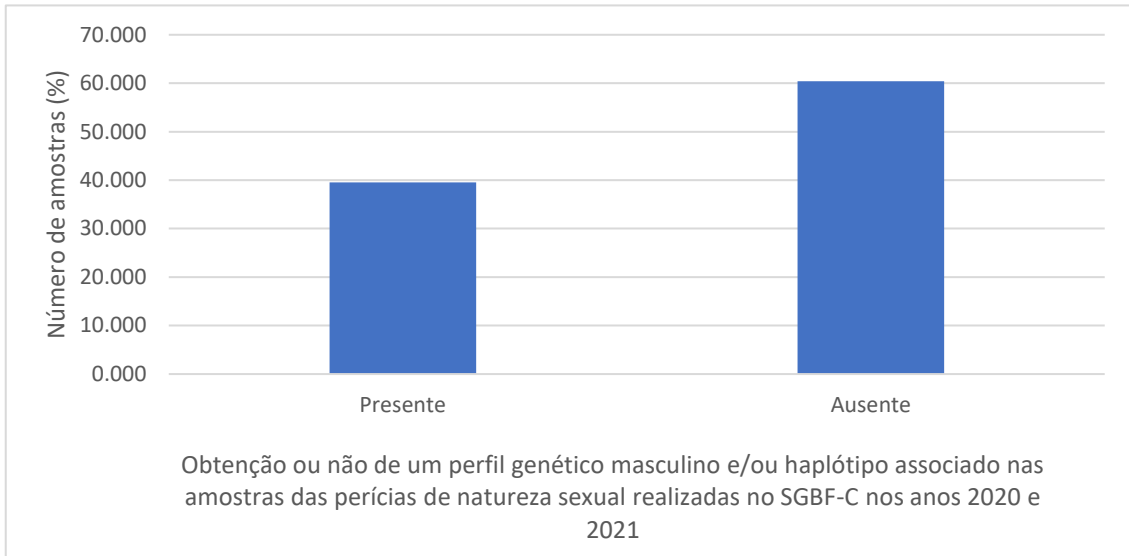
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Determinação de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado

Inicialmente, subdividiram-se as várias categorias organizadas e mencionadas na Tabela 2 em “Amostras com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo” e “Amostras sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo”, incorporando neste grupo as amostras não processadas, como também aquelas que obtiveram um perfil genético proveniente da vítima ou não valorizável.

Tal como descrito anteriormente, considerou-se que as categorias “Espéculo”, “Penso Higiénico”, “Zaragatoa oral” e “Zaragatoa peniana”, do grupo “Amostras com perfil genético masculino associado significativo” e a categoria “Zaragatoa peniana”, do grupo “Amostras sem perfil genético masculino associado e/ou haplótipo significativo” não tinham representatividade na amostragem a ser analisada, pelo que não foram sujeitas a qualquer tipo de avaliação.

Verificou-se que, de um total de 647 amostras analisadas, 256 possuíam perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo (39.6 %) e, como tal, tinham necessidade de realizar os testes preliminares para pesquisa de sémen, de modo a verificar se a amostra continha sémen ou outro fluido corporal. Por sua vez, 391 (60.4 %) não continham perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, não existindo necessidade de realizar os testes preliminares. O resultado encontra-se esquematizado na Figura 1.



*Figura 1: Número de amostras, expresso em percentagem, com e sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, provenientes das perícias sexuais realizadas no SGBF-C nos anos 2020 e 2021*

## 4.2. Comparação da presença de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, a quantidade de ADN masculino existente e o resultado dos testes preliminares para pesquisa de sémen

### 4.2.1. Relação entre a obtenção de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e a quantidade de ADN masculino existente

Inicialmente, determinou-se a percentagem de amostras com um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, isto é, com relevância para identificar o agressor, independentemente de ser um perfil genético e/ou haplótipo singular ou de mistura. Estas amostras foram divididas de acordo com a quantidade de material genético masculino existente: quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL; quantidade inferior a 0.01 ng/μL ou inexistência de ADN masculino.

Uma vez que todas as amostras pertencentes a este grupo continham material genético, o grupo “inexistência de ADN masculino” não foi considerado. O resultado encontra-se representado na Figura 2.

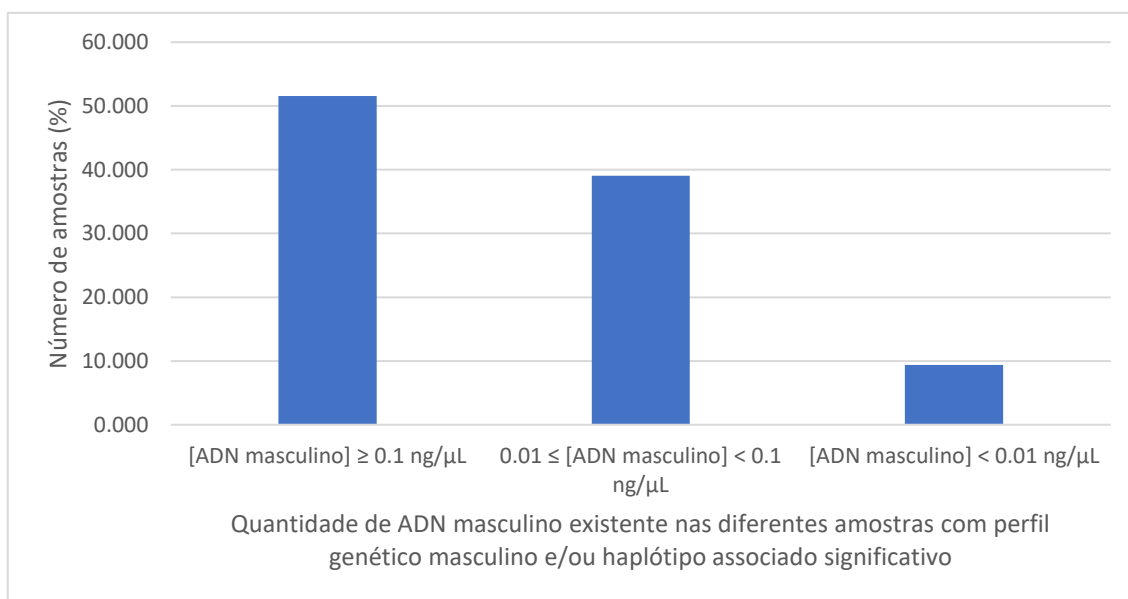


Figura 2: Número de amostras, expresso em percentagem, com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e a respetiva quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e quantidade inferior a 0.01 ng/μL

Pela análise dos resultados, averiguou-se que 51.6 % (132), 39.1 % (100) e 9.4 % (24) das amostras tiveram uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL, igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e inferior a 0.01 ng/μL, respetivamente. Como tal, 90.7 % das amostras contiveram uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.01 ng/μL.

Os resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que quanto maior a quantidade de material genético masculino, maior a probabilidade de obtenção de um perfil genético e/ou haplótipo relevante para identificar o agressor do crime (Butler, 2012b).

Como mencionado anteriormente, as amostras representadas neste grupo possuíram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, ou seja, o perfil genético ou haplótipo problema, independentemente de serem singulares ou de mistura, tiveram relevância na identificação do agressor do crime.

Contudo, observou-se que nem sempre o perfil genético ou haplótipo problema obtidos se encontravam completos, isto é, com resultados em todos os polimorfismos analisados. Como tal, foi necessário investigar se existia alguma relação entre a quantidade de ADN masculino existente e a presença de um perfil genético ou haplótipo do cromossoma Y completo ou incompleto. O resultado encontra-se representado na Figura 3.

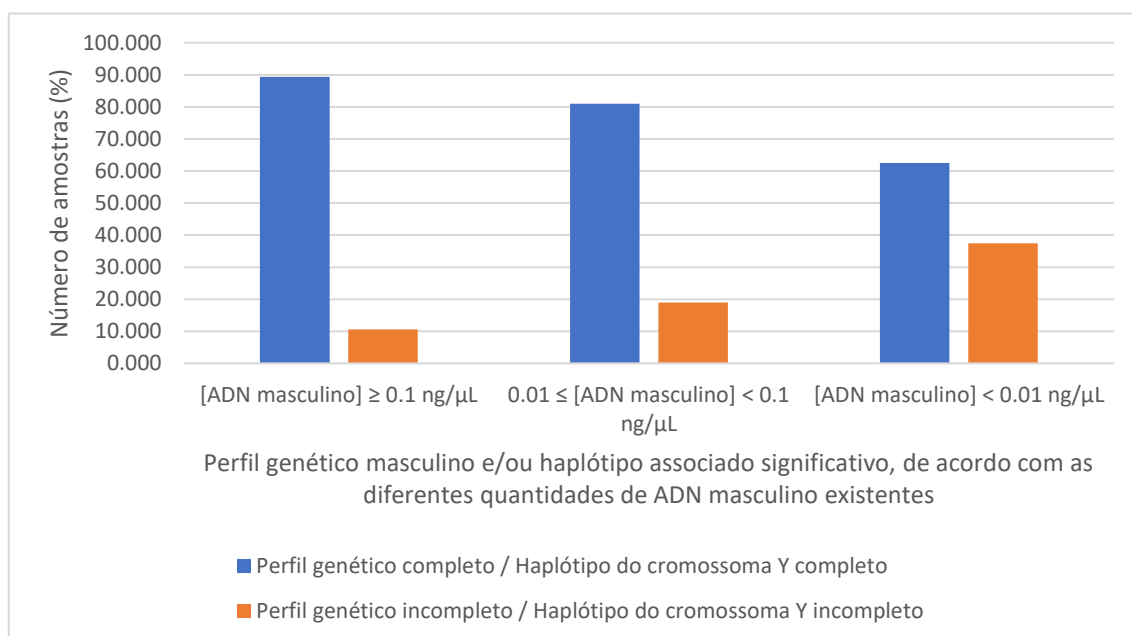


Figura 3: Obtenção de um perfil genético e/ou haplótipo do cromossoma Y completo (azul) ou incompleto (laranja), de acordo com as diferentes quantidades de ADN masculino existentes: quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e quantidade inferior a 0.01 ng/μL

## Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual

Verificou-se que 89.4 % (118), 81.0 % (81) e 62.5 % (15) das amostras com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL, igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e inferior a 0.01 ng/μL, respetivamente, obtiveram um perfil genético e/ou haplótipo do cromossoma Y completo.

Os resultados estão de acordo com o descrito na literatura: à medida que existiu uma menor quantidade de ADN masculino, a probabilidade de perda de alelos durante a amplificação foi maior, aumentando assim o número de perfis genéticos masculinos e/ou haplótipos incompletos (Butler, 2012b).

### 4.2.2. Relação entre o resultado do teste preliminar de orientação de PSA e a quantidade de ADN masculino existente

Avaliaram-se ainda os resultados dos testes preliminares obtidos para pesquisa de sémen destas amostras, nomeadamente nos testes de PSA e de CT, de acordo com as diferentes quantidades de ADN masculino existentes.

O resultado obtido no teste de PSA, de acordo com as diferentes quantidades de ADN masculino, encontra-se representado na Figura 4.

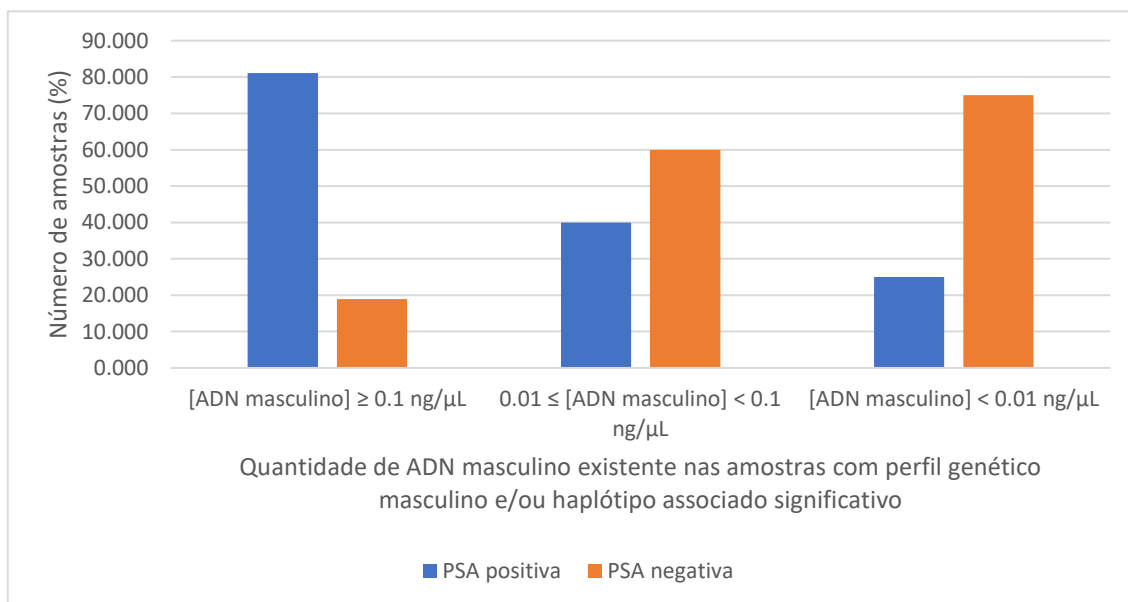


Figura 4: Número de amostras, expresso em percentagem, com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, que obtiveram um resultado positivo (azul) ou negativo (laranja) no teste de PSA, de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e quantidade inferior a 0.01 ng/μL

Verificou-se que 81.1 % (107), 40.0 % (40) e 25.0 % (6) das amostras com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/ $\mu$ L, igual ou superior a 0.01 ng/ $\mu$ L e inferior a 0.1 ng/ $\mu$ L e inferior a 0.01 ng/ $\mu$ L, respetivamente, obtiveram um resultado positivo no teste de PSA. Como tal, determinou-se que, das 256 amostras com um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, 59.8 % (153) possuíram um resultado positivo no teste de PSA.

Como abordado anteriormente, a sensibilidade do teste de PSA é bastante elevada, sendo que para concentrações de PSA iguais ou superiores a 2 ng/mL, é normalmente garantido um resultado positivo (Barbaro et al., 2015). Como tal, quanto maior for a quantidade de material genético masculino a ser analisado, maior é a probabilidade de o teste de PSA fornecer um resultado positivo fiável (Barbaro et al., 2015).

Apurou-se, ainda, pela análise da Figura 4, que, à medida que a quantidade de ADN masculino a ser analisado era menor, o número de resultados negativos no teste de PSA era maior. De acordo com a bibliografia, este resultado consegue ser explicado não só pelo facto de, eventualmente, não se encontrar presente sémen nas referidas amostras, mas também, e apesar da sensibilidade elevada do teste, uma quantidade muito reduzida de material genético masculino poder impedir a sua positividade (Barbaro et al., 2015).

Para além disso, é de notar que em casos de agressões sexuais em que ocorra penetração oral, digital ou sem ejaculação, não se encontra presente sémen, mas sim outro tipo de células ou fluidos corporais distintos, nomeadamente, a presença de células epiteliais. Nestes casos, é esperado que o teste de PSA seja negativo.

#### **4.2.3. Relação entre o resultado do teste preliminar de certeza de *Christmas Tree* e a quantidade de ADN masculino existente**

Como referido anteriormente, a PSA encontra-se presente, em pequenas quantidades, em outros fluidos corporais distintos do sémen, como a urina e secreções vaginais. Deste modo, dado que é um teste bastante sensível, poderá fornecer resultados falsos positivos para a presença de sémen.

Por este motivo, é sempre importante comprovar a sua presença através do teste de certeza de CT, realizado nas amostras que obtiveram um resultado positivo no teste de orientação de PSA.



## Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual

O resultado obtido, de acordo com as diferentes quantidades de ADN masculino existentes, encontra-se representado na Figura 5.

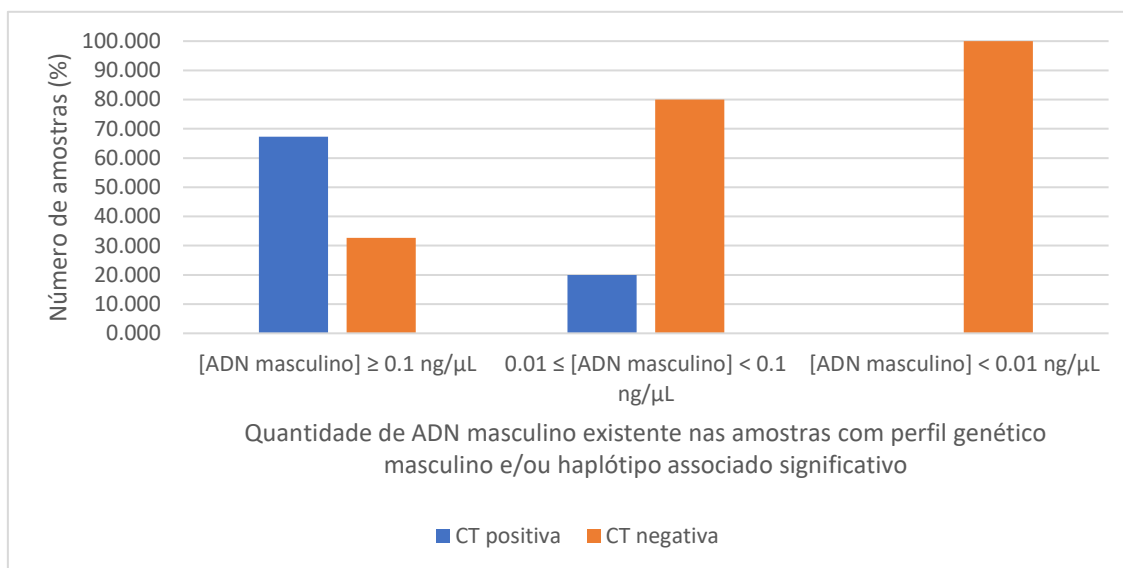


Figura 5: Número de amostras, expresso em percentagem, com perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, que obtiveram um resultado positivo (azul) ou negativo (laranja) no teste preliminar de certeza para pesquisa de sêmen CT, de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL e quantidade inferior a 0.01 ng/μL.

Pela análise dos resultados obtidos, apurou-se que 67.3 % (72) e 20.0 % (8) das amostras com um resultado positivo no teste de PSA, sujeitas ao teste de CT e com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL e igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL, respetivamente, também obtiveram um resultado positivo. Por sua vez, 100.0% (6) das amostras com uma quantidade inferior a 0.01 ng/μL obtiveram um resultado negativo. Como tal, verificou-se que, das 153 amostras com PSA positiva, apenas 52.3 % (80) positivaram no teste de CT.

De acordo com a bibliografia, a ausência de espermatozoides, detetáveis nesta prática, não é sinónimo de inexistência de agressão sexual, uma vez que a quantidade reduzida de ADN a ser analisada pode impossibilitar a observação de espermatozoides ao microscópio, o agressor do crime pode ser vasectomizado ou azoospérmico, a penetração pode ter ocorrido sem ejaculação ou ter sido digital ou oral, ou até mesmo, nos casos de penetração anal, os espermatozoides podem ser degradados por enzimas bacterianas (Cainé et al., 2008; Hampton, 1995; Magalhães et al., 2015; Sibille et al., 2002).

### 4.3. Comparação da inexistência de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, a quantidade de ADN masculino existente e os testes preliminares para pesquisa de sémen

#### 4.3.1. Relação entre a inexistência de um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e a quantidade de ADN masculino existente

De acordo com o mencionado na Figura 1, também se determinou a percentagem de amostras sem um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, isto é, sem um perfil ou haplótipo de relevância para identificar o agressor. Estas amostras foram divididas de acordo com a quantidade de material genético masculino existente: quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL; quantidade inferior a 0.01 ng/μL e inexistência de ADN masculino.

O resultado obtido encontra-se descrito na Figura 6.

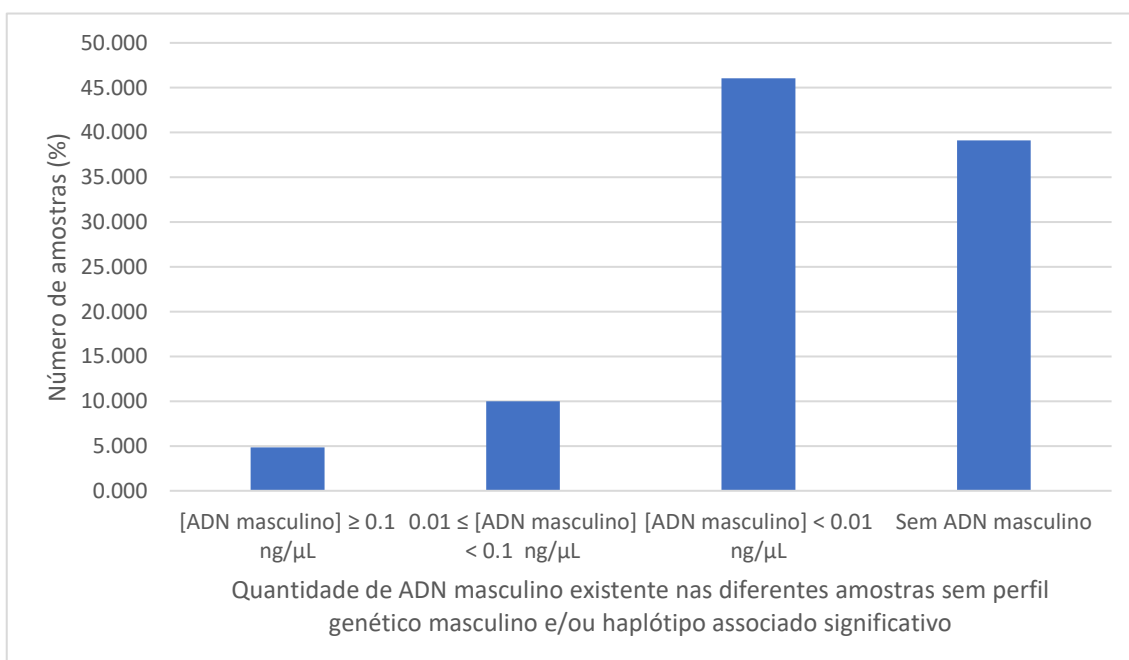


Figura 6: Número de amostras, expresso em percentagem, sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e respetiva quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL; quantidade inferior a 0.01 ng/μL e inexistência de ADN masculino

## Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual

Pela análise dos resultados, determinou-se que 4.9 % (19), 10.0 % (39), 46.0 % (180) e 39.1 % (153) das amostras sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo continham uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL, igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL, inferior a 0.01 ng/μL e sem ADN masculino, respetivamente. Foi possível verificar que a maioria das amostras deste grupo, nomeadamente 85.1 %, conteve uma quantidade de ADN masculino muito reduzida, isto é, inferior a 0.01 ng/μL, ou até mesmo nula, podendo impedir a obtenção de um perfil genético masculino e/ou haplótipo significativo (Cainé et al., 2008; Magalhães et al., 2015; Sibille et al., 2002).

Uma pequena percentagem de amostras (14.9 %) conteve uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.01 ng/μL, cujo perfil genético masculino e/ou haplótipo obtido não foi relevante para a resolução da perícia. Como tal, investigou-se, para estes casos, se as amostras provinham de vítimas do sexo masculino e, como tal, justificativas da quantidade elevada de ADN masculino ou de amostras não processadas. O resultado encontra-se representado na Figura 7.

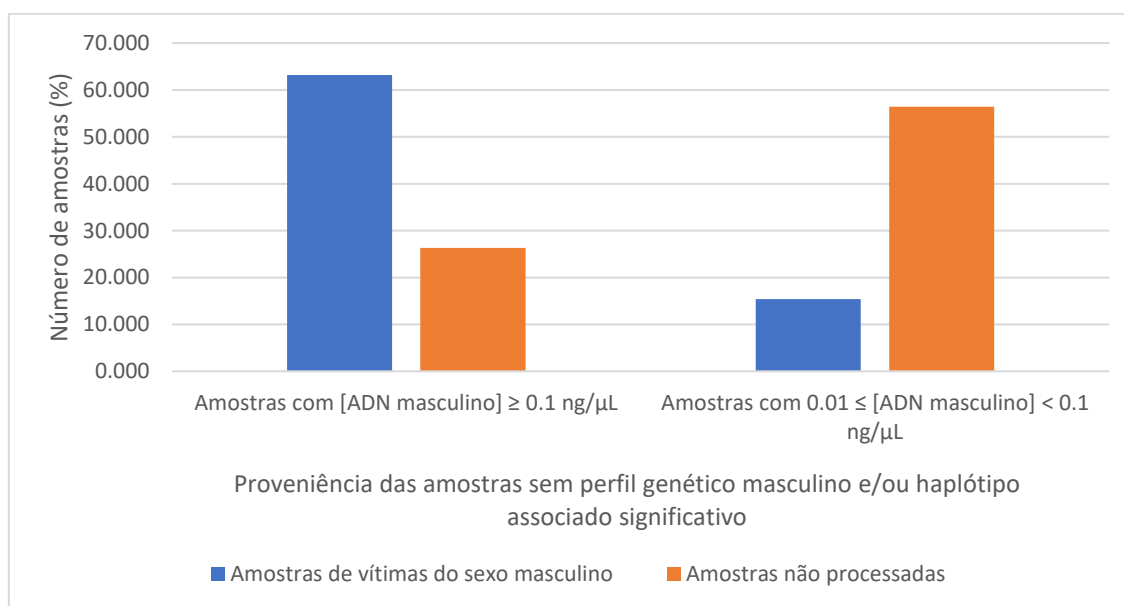


Figura 7: Número de amostras, expresso em percentagem, sem um perfil genético masculino associado e/ou haplótipo significativo, provenientes de vítimas do sexo masculino (azul) ou de amostras não processadas (laranja), com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL, à esquerda, e igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL, à direita

Apurou-se que 63.2 % (12) e 26.3 % (3) das amostras com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL eram provenientes de vítimas do sexo masculino e, como tal, justificativas da quantidade elevada de ADN masculino existente,

e de amostras não processadas, respetivamente. Por sua vez, 15.4 % (6) e 56.4 % (22) das amostras com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL, eram provenientes de vítimas do sexo masculino e de amostras não processadas, respetivamente.

### 4.3.2. Relação entre o resultado do teste preliminar de orientação de PSA e a quantidade de ADN masculino existente

Avaliaram-se também os resultados obtidos nos testes preliminares para pesquisa de sémen das amostras que não possuíram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, nomeadamente no teste de PSA, uma vez que nenhuma amostra sujeita ao teste de CT positivou.

O resultado obtido no teste de PSA, tendo em consideração a quantidade de material genético existente, encontra-se representado na Figura 8.

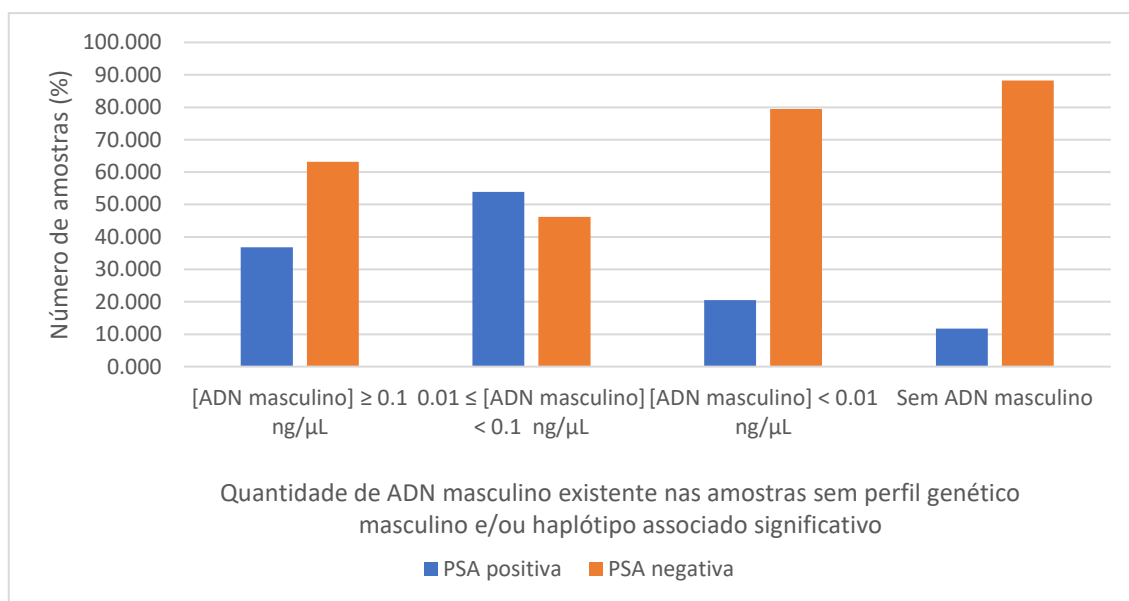


Figura 8: Número de amostras, expresso em percentagem, sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, que obteve um resultado positivo (azul) ou negativo (laranja) no teste de PSA, de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/μL; quantidade igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL; quantidade inferior a 0.01 ng/μL e inexistência de ADN masculino

Pela análise dos resultados, verificou-se que 36.8 % (7), 53.8 % (21), 20.6 % (37) e 11.8 % (18) das amostras com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/μL, igual ou superior a 0.01 ng/μL e inferior a 0.1 ng/μL, inferior a 0.01

## Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual

ng/ $\mu$ L e sem ADN masculino, respetivamente, obtiveram um resultado positivo no teste de PSA. Determinou-se, assim, que de um total de 391 amostras sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, apenas 21.2 % (83) obtiveram um resultado positivo no teste de PSA.

Contudo, verificou-se que existiu uma elevada percentagem de amostras, nomeadamente, 36.8 % e 53.8 %, com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/ $\mu$ L e igual ou superior a 0.01 ng/ $\mu$ L e inferior a 0.1 ng/ $\mu$ L, respetivamente, que obtiveram um resultado positivo no teste de PSA, não possuindo, posteriormente, qualquer perfil genético masculino e/ou haplótipo associado. Como tal, avaliou-se que tipo de amostras obteve este resultado não expectável. O resultado encontra-se representado na Figura 9.

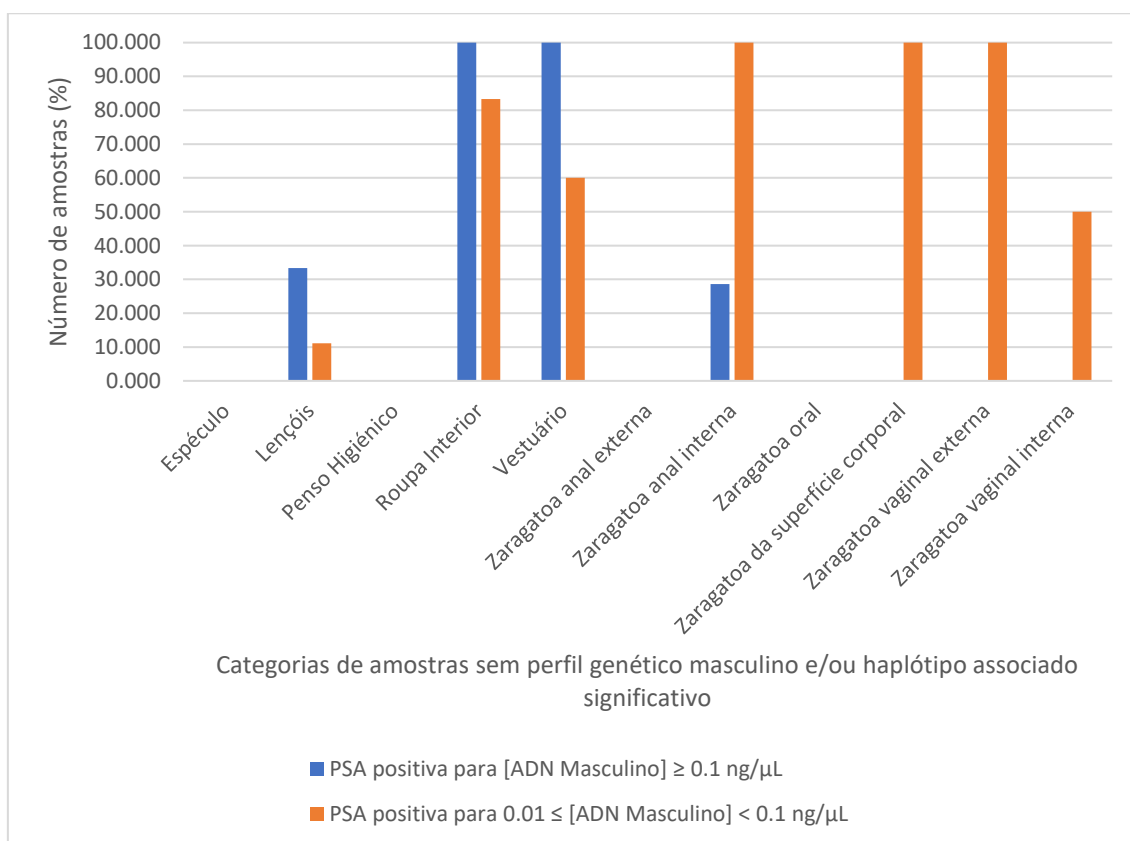


Figura 9: Número de amostras, expresso em percentagem, pertencente a cada categoria de amostra sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e com um resultado positivo no teste de PSA, de acordo com a quantidade de ADN masculino existente: quantidade igual ou superior a 0.1 ng/ $\mu$ L (azul) e quantidade igual ou superior a 0.01 ng/ $\mu$ L e inferior a 0.1 ng/ $\mu$ L (laranja)

Pela análise dos resultados, verificou-se que as categorias “Espéculo”, “Penso higiénico”, “Zaragatoa anal externa” e “Zaragatoa oral” não obtiveram qualquer resultado

positivo no teste de PSA para uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.01 ng/ $\mu$ L.

Para uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/ $\mu$ L, 33.3 % (1) e 28.6 % (2) das categorias “Lençóis” e “Zaragatoa anal interna”, respetivamente, obtiveram um resultado positivo no teste de PSA, bem como a totalidade das amostras das categorias “Roupa interior” (1) e “Vestuário” (3).

Para uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.01 ng/ $\mu$ L e inferior a 0.1 ng/ $\mu$ L, 11.1 % (1), 83.3 % (10), 60.0 % (6) e 50.0 % (1) das categorias “Lençóis”, “Roupa interior”, “Vestuário” e “Zaragatoa vaginal interna”, respetivamente, também obtiveram um resultado positivo para o teste de PSA, tal como a totalidade das amostras da categoria “Zaragatoa anal interna” (1), “Zaragatoa da superfície corporal” (1) e “Zaragatoa vaginal externa” (1).

Apesar de estas amostras conterem uma quantidade de ADN masculino elevada, é de notar que 57.1 % (16) não sofreu qualquer processamento, uma vez que, ao ser determinada a quantidade de ADN existente, se verificou que existiam amostras mais promissoras de serem amplificadas ou relevantes no contexto da agressão sexual, de modo a estabelecer um perfil genético ou haplótipo completo, como indicado na literatura (Butler, 2012b).

Autores referem que a glicoproteína PSA pode encontrar-se presente, apesar de em concentrações muito reduzidas, noutros fluidos corporais distintos do sémen (Denison et al., 2004; Manello F. et al., 1998; H Yu et al., 1999, 1995). Como mencionado anteriormente, a urina é um dos fluidos corporais que pode conter a PSA em elevadas quantidades, quando comparado com os restantes fluidos, devido a tecidos do trato urogenital feminino, mas também à utilização de contraceptivos orais, nas vítimas do sexo feminino, e ao desenvolvimento da próstata e a determinadas displasias existentes, nas vítimas do sexo masculino (Denison et al., 2004; Manello F. et al., 1998; Seratec®, 2006; H Yu et al., 1999). Amostras que possam conter vestígios de urina, como “Lençóis”, “Roupa interior” ou “Vestuário”, mesmo que em pequena quantidade, podem positivar no teste de PSA, sem possuírem material genético masculino de relevância.

As amostras que possam possuir saliva, como “Zaragatoa da superfície corporal”, também podem positivar no teste de PSA, devido à utilização de contraceptivos orais, nas mulheres, ou à existência de alguns problemas de saúde, como carcinomas da próstata, hiperplasia benigna da próstata ou outras doenças urológicas, nos homens (Aksoy et al., 2002; Denison et al., 2004; Manello F. et al., 1998; H Yu et al., 1999).

## **Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

Além do mais, nas vítimas do sexo feminino, é de notar que é possível detetar uma pequena quantidade de PSA, nomeadamente em secreções vaginais, uma vez que a síntese da glicoproteína pode ser induzida por hormonas esteroides, existentes em diversos tecidos da mulher (Nagar et al., 2013; Wahed et al., 2019). Como tal, amostras da categoria “Zaragatoa vaginal externa” e “Zaragatoa vaginal interna” podem positivar no teste de PSA, não possuindo qualquer material genético masculino.

Em amostras anais, como “Zaragatoa anal interna”, as enzimas bacterianas podem justificar o facto de não se detetar espermatozoides ou material genético de relevância, pois podem degradá-los (Hampton, 1995; Sibille et al., 2002).

Como tal, é possível que um teste de PSA positivo, não contendo material genético masculino de relevância.

Contudo, é também de notar que o teste de PSA é muito sensível, podendo detetar a glicoproteína numa baixa concentração. Assim, é plausível que um teste de PSA, mesmo com uma pequena quantidade de material genético presente, detete a glicoproteína, mas não exista uma quantidade suficiente para se detetar espermatozoides através da técnica de *Christmas Tree*, nem para fornecer um perfil genético e/ou haplótipo de relevância forense. Como tal, nestes casos, não se consegue comprovar a existência de um crime sexual, uma vez que o teste de PSA é orientativo (Barbaro et al., 2015; Denison et al., 2004).

#### **4.4. Avaliação da duração e custo dos testes preliminares**

De modo a avaliar o tempo necessário para a realização dos testes preliminares para pesquisa de sémen, nomeadamente para a obtenção de resultados, cronometraram-se 40 procedimentos de PSA e de CT, realizados nas perícias de natureza sexual no SGBF-C ao longo dos anos de 2021 e 2022.

Como mencionado anteriormente, no teste de PSA, considerou-se para esta avaliação, para além do tempo médio necessário para a obtenção de resultados, todo o procedimento a realizar antes (procura e recolha das amostras do local onde se encontravam armazenadas) e posteriormente (inserção dos resultados no *software LIMS* do SGBF-C).

Por sua vez, em relação ao teste de CT, apenas se considerou o tempo médio despendido na observação microscópica, de modo a averiguar a desigualdade, consoante o resultado fosse positivo ou negativo. Avaliaram-se 20 CT positivas e 20 CT negativas.

Relativamente ao teste de PSA, considerou-se um tempo médio de 2.43 horas para a obtenção de resultados.

Como indicado anteriormente, nos anos 2020 e 2021, 650 amostras provenientes de 149 perícias sexuais foram sujeitas ao teste preliminar de PSA, sendo que apenas 647 foram avaliadas, pois tiveram representatividade na amostragem.

De acordo com o fluxo de trabalho laboratorial atualmente implementado no SGBF-C, todas as amostras em que é solicitada a pesquisa de sémen são sujeitas ao teste de PSA, sendo que se este teste obtiver um resultado positivo, é necessário realizar o de CT.

Contudo, determinou-se que apenas 256 amostras tinham necessidade de realizar os testes preliminares, pois obtiveram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, sendo necessário comprovar se a amostra continha sémen ou outro fluido corporal.

Como tal, investigou-se o tempo médio despendido na realização do teste de PSA, de acordo com o fluxo de trabalho laboratorial atualmente imposto no SGBF-C e o tempo médio necessário a despendar, se apenas se realizasse o teste nas amostras com necessidade. O resultado encontra-se representado na Figura 10.



## Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual

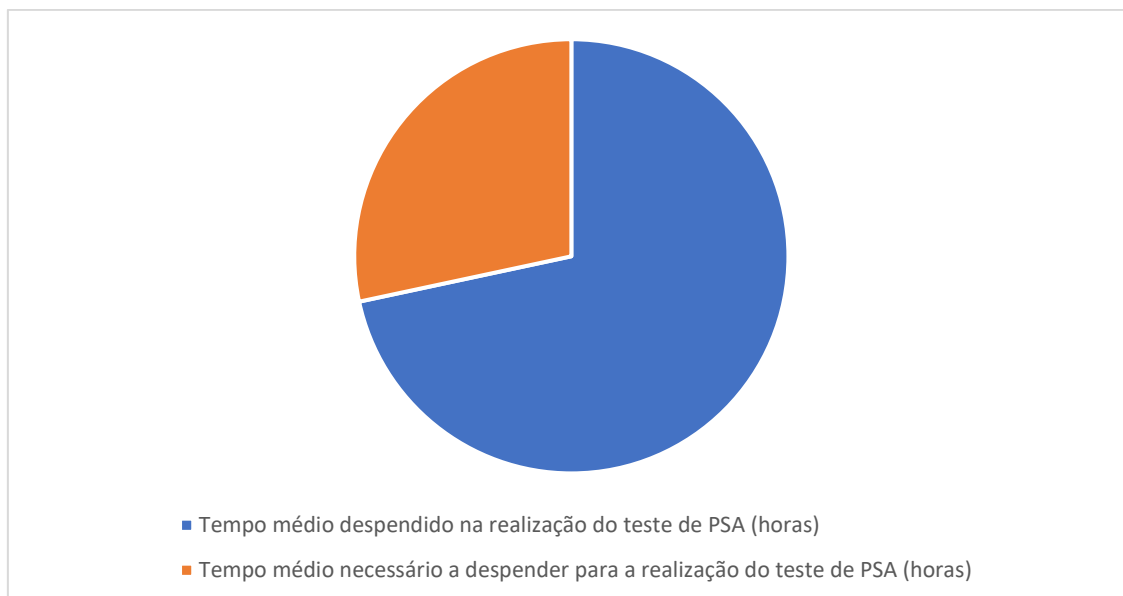


Figura 10: Tempo médio despendido, em horas, na realização do teste de PSA, de acordo com o fluxo de trabalho laboratorial atualmente implementado no SGBF-C (azul) e tempo médio necessário a despendido, se apenas se considerassem as amostras com necessidade (laranja)

Pela análise dos resultados, determinou-se que o tempo médio despendido no teste de PSA, de acordo com o fluxo de trabalho laboratorial atualmente imposto no SGBF-C, foi superior (1572.2 horas) ao tempo médio necessário a despendido (622.1 horas). Assim, se apenas se realizasse o teste de PSA nas amostras com necessidade, haveria um decréscimo de 60.4 % em relação ao tempo médio atualmente despendido, diretamente proporcional ao número de amostras sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo.

Uma vez que se considerou que o valor monetário do teste de PSA poderia variar de acordo com o fornecedor, avaliou-se apenas a proporção do custo atualmente despendido e do necessário a despendido. Como tal, verificou-se que haveria igualmente um decréscimo de 60.4 % em relação ao custo monetário atualmente despendido.

Simultaneamente a esta pesquisa, cronometraram-se, também, 40 testes de CT, considerando-se, apenas, a observação da lâmina preparada ao microscópio, de acordo com o resultado obtido. O tempo necessário de preparação das lâminas não foi avaliado, uma vez que era idêntico para todas as amostras, independentemente do seu resultado. Avaliaram-se 20 testes com um resultado positivo e 20 com um resultado negativo.

O valor monetário despendido para a realização do referido teste não foi sujeito a qualquer tipo de avaliação, uma vez que os reagentes utilizados podem ser aproveitados para um grande número de amostras, não sendo significativo o custo de cada um destes testes.

Como tal, consideraram-se dois tempos médios despendidos, de acordo com o resultado obtido, representados na Figura 11.

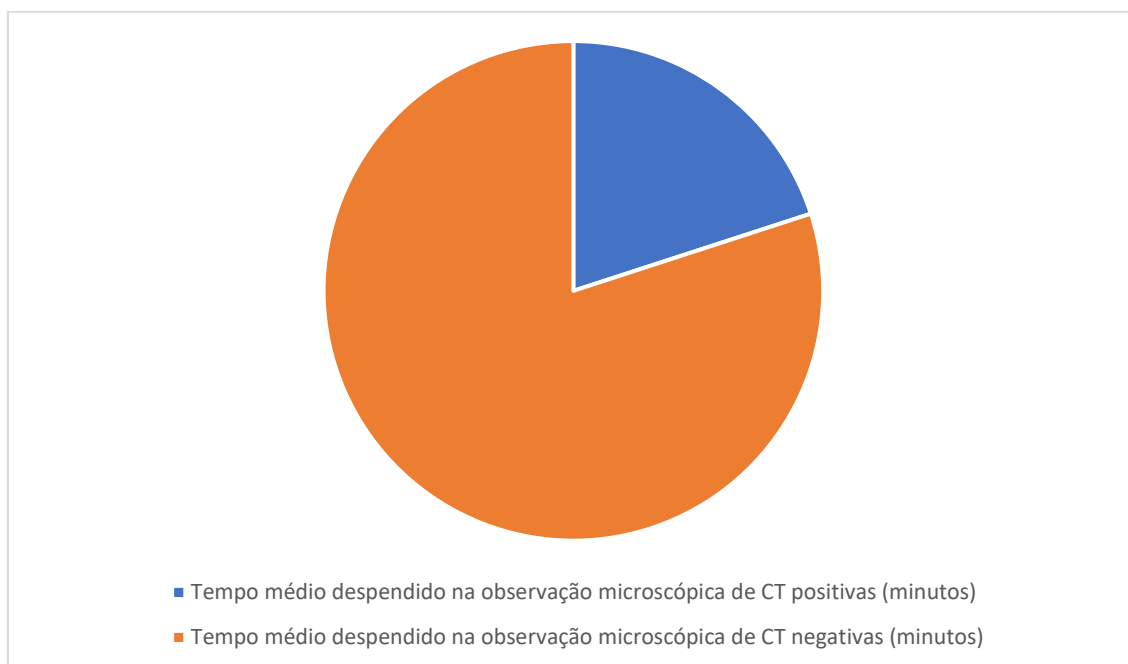


Figura 11: Tempo médio despendido, em minutos, na observação microscópica de CT positivas (azul) e de CT negativas (laranja)

Determinou-se que o tempo médio de detecção dos espermatozoides ao microscópio era menor para CT positivas (3.0 minutos), em comparação com as CT negativas (12.0 minutos).

No estudo efetuado, detetou-se que 153 amostras com um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e 83 sem um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo obtiveram um resultado positivo no teste de PSA e como tal, realizaram também o teste de CT. Dessas 236 amostras, apenas 33.9 % (80) obtiveram um resultado positivo no teste preliminar de certeza.

Assim, e considerando que apenas as amostras com um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo e com um resultado positivo no teste de PSA (153) teriam necessidade de realizar o teste de CT, determinou-se o tempo médio despendido na observação microscópica de todas as amostras analisadas (236), bem como o tempo médio necessário a despendido, se apenas se realizasse o teste de CT nas amostras com necessidade. O resultado encontra-se presente na Figura 12.

## Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual

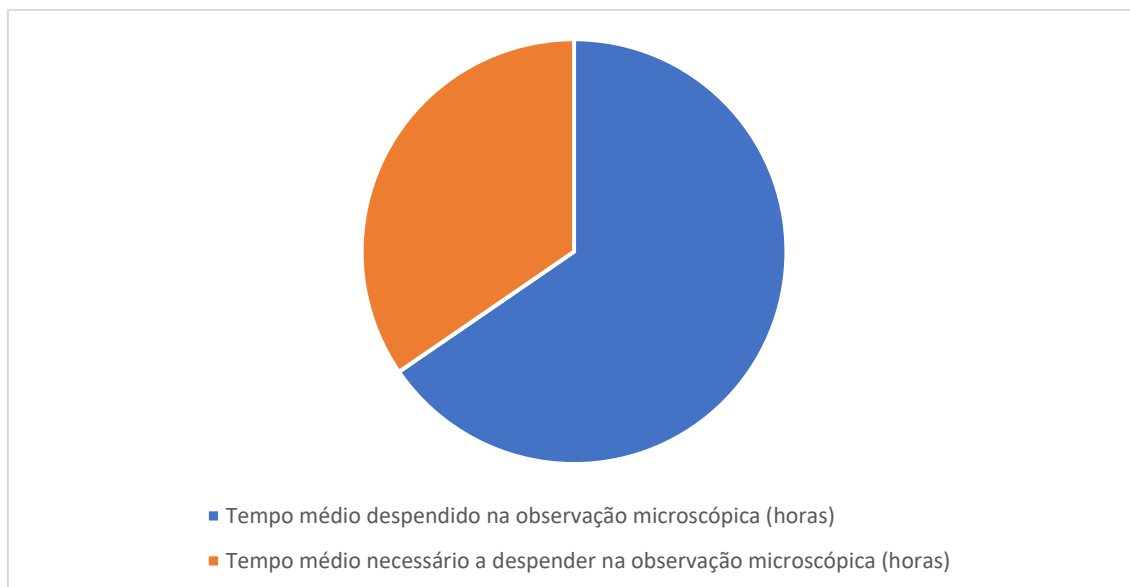


Figura 12: Tempo médio despendido, em horas, na observação microscópica do teste de CT, de acordo com o fluxo de trabalho atualmente implementado no SGBF-C (azul) e o necessário a despendido, se apenas se considerassem as amostras com necessidade (laranja)

Pela análise dos resultados obtidos, verificou-se que o tempo médio despendido na observação microscópica do teste de CT, de acordo com o fluxo de trabalho laboratorial atualmente implementado no SGBF-C, foi superior (35.2 horas) ao tempo médio necessário a despendido, se apenas se realizasse o referido teste nas amostras que obtiveram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo (18.6 horas). Como tal, apenas 52.8 % do tempo seria necessário, havendo um decréscimo de 47.2 % em relação ao tempo médio atualmente despendido.



## 5. Conclusões

Com este estudo, foi possível concluir que nas perícias sexuais realizadas nos anos 2020 e 2021 no SGBF-C, 39.6 % das amostras obtiveram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado com relevância forense, a maioria das quais com uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.01 ng/ $\mu$ L, sendo necessário realizar os testes preliminares para determinar se o material biológico presente era sémen ou outro fluido corporal.

Comprovou-se que, para uma quantidade reduzida de material genético masculino, a probabilidade de perda de alelos durante a amplificação era elevada, traduzindo-se num aumento de perfis genéticos masculinos e/ou haplótipos incompletos.

Para uma quantidade de ADN masculino igual ou superior a 0.1 ng/ $\mu$ L, uma elevada quantidade de amostras (81.1 %) obteve um resultado positivo no teste preliminar de orientação de PSA, demonstrando assim que este fornecia um grande número de resultados positivos fiáveis para uma elevada concentração de ADN masculino.

Contudo, para uma quantidade diminuta de material genético masculino, os resultados positivos eram menores. Estes dados permitiram mostrar que os resultados negativos podiam ser explicados não só por não se encontrar presente sémen, mas também porque uma quantidade muito reduzida de ADN masculino podia impedir a positividade do teste.

Tendo em conta que todas as amostras que obtiveram um resultado positivo no teste de PSA foram também sujeitas ao teste preliminar de certeza *Christmas Tree*, detetou-se que apenas 52.3 % das amostras tiveram um resultado positivo, sendo que para quantidades elevadas de ADN masculino, nomeadamente superiores a 0.1 ng/ $\mu$ L, os números de resultados positivos no teste de CT foram elevados (67.3 %). No entanto, para quantidades reduzidas de ADN masculino, a quantidade de resultados positivos neste teste foi diminuta ou até mesmo nula, demonstrando que, para estas quantidades, dificilmente se consegue obter um resultado positivo no teste de CT, impossibilitando, assim, a confirmação da presença de sémen na amostra a ser analisada.

Por sua vez, 60.4 % das amostras analisadas das perícias sexuais realizadas no SGBF-C nos anos 2020 e 2021 não possuíram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, e, como tal, não tinham necessidade de realizar os testes preliminares para determinação da presença de sémen, sendo que a maioria das

amostras deste grupo possuíram uma quantidade muito reduzida ou até mesmo nula de ADN masculino.

Quanto menor a quantidade de ADN masculino a ser analisado, maior o número de resultados negativos no teste de PSA, comprovando que, apesar da elevada sensibilidade do teste de PSA, uma quantidade diminuta de material genético masculino podia impedir a positividade do teste.

A presença da PSA em outros fluidos corporais, como urina, secreções vaginais e saliva, conseguiu justificar o resultado positivo do teste em amostras que não contiveram um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, como “Lençóis”, “Roupa interior”, “Vestuário”, “Zaragatoa da superfície corporal”, “Zaragatoa vaginal externa” e “Zaragatoa vaginal interna”. A presença de enzimas bacterianas, ao degradarem e impedirem a deteção e visualização de espermatozoides em amostras anais, puderam justificar o resultado positivo no teste de PSA e negativo de CT.

Contudo, a elevada sensibilidade do teste de PSA pode permitir a obtenção de resultados positivos fiáveis, mesmo com uma pequena quantidade de ADN masculino. No entanto, não existindo uma quantidade suficiente para detetar espermatozoides ao microscópio ou até mesmo para obter um perfil genético masculino e/ou haplótipo de relevância forense, não é possível confirmar, nestes casos, a presença de sémen nas amostras analisadas, nem comprovar a existência de um crime sexual, pois este teste é apenas orientativo.

Confirmou-se que, ao realizarem-se os testes preliminares de pesquisa de sémen apenas nas amostras que obtivessem um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, haveria um decréscimo do custo e tempo despendidos para a realização do teste de PSA, proporcional ao número de amostras sem perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo (60.4 %), bem como um decréscimo do tempo despendido na observação microscópica do teste de CT (47.2 %).

Assim, é possível afirmar que a metodologia laboratorial atualmente imposta no SGBF-C possui vantagens, nomeadamente a elevada sensibilidade do teste de PSA, sendo possível detetar a glicoproteína, quando esta se encontra presente numa quantidade reduzida, e a elevada especificidade e sensibilidade do teste de *Christmas Tree*.

No entanto, existem grandes desvantagens na metodologia atualmente implementada, tais como: impossibilidade de confirmar a ocorrência de um crime sexual ou a presença de sémen, se apenas o teste de PSA positivar, pois é um teste orientativo; realização de testes preliminares para pesquisa de sémen de forma desnecessária, pois

**Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

existe normalmente um elevado número de amostras que não possui um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, não sendo possível confirmar, através da sua realização, a existência de um crime sexual, acarretando assim tempo e custo elevados despendidos na realização dos testes preliminares de PSA e CT.





## 6. Perspetivas futuras

De acordo com o estudo efetuado e as conclusões obtidas, é importante sugerir a alteração do fluxo de trabalho laboratorial atualmente implementado no SGBF-C para pesquisa de sémen, realizando os testes preliminares para determinar a sua presença apenas nas amostras que obtenham um perfil genético masculino e/ou haplótipo associado significativo, isto é, relevante para identificar o agressor do crime, de forma a ser possível rentabilizar o tempo e o custo despendidos na sua realização.

Para além disso, será também importante avaliar outras metodologias realizadas no SGBF-C, como a determinação da presença de sangue ou de saliva em amostras criminais, de forma a que possam ser igualmente otimizadas.



## 7. Bibliografia

- Ajmeri, J. R., & Ajmeri, C. J. (2010). Nonwoven personal hygiene materials and products. In *Applications of Nonwovens in Technical Textiles* (pp. 85–102). Elsevier. doi: 10.1533/9781845699741.2.85
- Aksoy, H., Akçay, F., Umudum, Z., Yildirim, A. K., & Memisogullari, R. (2002). Changes of PSA concentrations in serum and saliva of healthy women during the menstrual cycle. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 32(1), 31–36.
- Allery, J.-P., No, T., Mieusset, R., Blanc, A., & Rougé, D. (2001). Cytological Detection of Spermatozoa: Comparison of Three Staining Methods. *Journal of Forensic Sciences*, 46, 349–351. doi: 10.1520/JFS14970J
- Allery, J.-P., Telmon, N., Blanc, A., Mieusset, R., & Rougé, D. (2003). Rapid detection of sperm: comparison of two methods. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 10(1), 5–7. doi: 10.1016/S1353-1131(02)00158-X
- Altayari, W. (2016). DNA extraction: Organic and solid-Phase. *Methods in Molecular Biology*, 1420, 55–68. doi: 10.1007/978-1-4939-3597-0\_5
- Antoniou, A., Papanastasiou, P., Stephanidis, A., Diamandis, E., & Androulakakis, P. A. (2004). Assessment of serum prostate specific antigen in childhood. *BJU International*, 93(6), 838–840. doi: 10.1111/j.1464-410X.2003.04740.x
- Applied Biosystems. (2008). *PrepFiler™™ Forensic DNA Extraction Kit User Guide*.
- Astrup, B. S., Thomsen, J. L., Lauritsen, J., & Ravn, P. (2012). Detection of spermatozoa following consensual sexual intercourse. *Forensic Science International*, 221(1–3), 137–141. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.04.024
- Barbaro, A., Cormaci, P., Votano, S., & la Marca, A. (2015). Evaluation study about the SERATEC® rapid tests. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e63–e64. doi: 10.1016/j.fsigss.2015.09.025
- Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M., & Lago, G. (2007). Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. In *Talanta* (Vol. 72, Issue 3, pp. 896–913). Elsevier. doi: 10.1016/j.talanta.2006.12.045
- Bitner, S. E. (2012). False Positives Observed on the Seratec® PSA SemiQuant Cassette Test with Condom Lubricants. *Journal of Forensic Sciences*, 57(6), 1545–1548. doi: 10.1111/j.1556-4029.2012.02141.x
- Bloch, W. (1991). *A Biochemical Perspective of the Polymerase Chain Reaction* (Vol. 30).

- Boland, C. A., McDermott, S. D., & Ryan, J. (2007). Clothing damage analysis in alleged sexual assaults—The need for a systematic approach. *Forensic Science International*, *167*(2–3), 110–115. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.06.038
- Bonilha, V. L., Rayborn, M. E., Shadrach, K., Åke Lundwall, Malm, J., Bhattacharya, S. K., Crabb, J. W., & Hollyfield, J. G. (2006). Characterization of semenogelin proteins in the human retina. *Experimental Eye Research*, *83*(1), 120–127. doi: 10.1016/j.exer.2005.11.011
- Boward, E. S., & Wilson, S. L. (2013). A comparison of ABACard(®) p30 and RSID™-Semen test kits for forensic semen identification. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, *20*(8), 1126–1130. doi: 10.1016/j.jflm.2013.09.007
- Brayley-Morris, H., Sorrell, A., Revoir, A. P., Meakin, G. E., Court, D. S., & Morgan, R. M. (2015). Persistence of DNA from laundered semen stains: Implications for child sex trafficking cases. *Forensic Science International: Genetics*, *19*, 165–171. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.07.016
- Breul, J., Pickl, U., & Hartung, R. (1994). Prostate-Specific Antigen in Urine. In *Eur Urol* (Vol. 26).
- Burg, A., Kahn, R., & Welch, K. (2011). DNA testing of sexual assault evidence: The laboratory perspective. In *Journal of Forensic Nursing* (Vol. 7, Issue 3, pp. 145–152). doi: 10.1111/j.1939-3938.2011.01111.x
- Burnier, C., Kelly, M., DeTata, D., & Pitts, K. (2021). Investigation of condom evidence in cases of sexual assault: Case studies. *Forensic Science International: Reports*, *4*, 100221. doi: 10.1016/j.fsir.2021.100221
- Butler, J. M. (2009). DNA Quantification. In *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (pp. 111–124).
- Butler, J. M. (2010a). Short Tandem Repeat Markers. In *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (pp. 147–173). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374999-4.00008-4
- Butler, J. M. (2010b). Statistical Interpretation. In *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (pp. 229–258). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374999-4.00011-4
- Butler, J. M. (2010c). Basics of DNA Biology and Genetics. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, 19–41. doi: 10.1016/B978-0-12-374999-4.00002-3
- Butler, J. M. (2012a). Chapter 13 - Y-Chromosome DNA Testing. In J. M. Butler (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (pp. 371–403). San Diego: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00013-0>
- Butler, J. M. (2012b). DNA Quantitation. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing* (pp. 49–67). Elsevier. doi: 10.1016/b978-0-12-374513-2.00003-8

**Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

- Butler, J. M. (2012c). PCR Amplification. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing* (pp. 69–97). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374513-2.00004-X
- Butler, J. M. (2012d). Sample Collection, Storage, and Characterization. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing* (pp. 1–27). Elsevier. doi: 10.1016/b978-0-12-374513-2.00001-4
- Butler, J. M. (2012e). Capillary Electrophoresis: Principles and Instrumentation. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*, 141–165. doi: 10.1016/B978-0-12-374513-2.00006-3
- Butler, J. M. (2012f). DNA Extraction Methods. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*, 29–47. doi: 10.1016/B978-0-12-374513-2.00002-6
- Cainé, L., & Pinheiro, M. de F. (2008). Agressões Sexuais. In M. Pinheiro (Ed.), *CSI Criminal* (pp. 41–57).
- Camarena, L. R., Glasscock, B. K., Daniels, D., Ackley, N., Sciarretta, M., & Seashols-Williams, S. J. (2017). An Optimized Centrifugal Method for Separation of Semen from Superabsorbent Polymers for Forensic Analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 62(2), 411–416. doi: 10.1111/1556-4029.13294
- Casali, F., Ciavaglia, S. A., Ganniciffe, C., Lidstone, N., & Webster, L. M. I. (2020). Validation of presumptive tests for non-human blood using Kastle Meyer and Hemastix reagents. *Science & Justice*, 60(1), 30–35. doi: 10.1016/j.scijus.2019.10.003
- Casey, D. G., Domijan, K., MacNeill, S., Rizet, D., O'Connell, D., & Ryan, J. (2017). The Persistence of Sperm and the Development of Time Since Intercourse (TSI) Guidelines in Sexual Assault Cases at Forensic Science Ireland, Dublin, Ireland. *Journal of Forensic Sciences*, 62(3), 585–592. doi: 10.1111/1556-4029.13325
- Casey, D. G., & Price, J. (2010). The sensitivity and specificity of the RSID™-saliva kit for the detection of human salivary amylase in the Forensic Science Laboratory, Dublin, Ireland. *Forensic Science International*, 194(1–3), 67–71. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.10.009
- Castelló, A., Alvarez, M., & Verdú, F. (2002). Accuracy, Reliability, and Safety of Luminol in Bloodstain Investigation. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 35(3), 113–121. doi: 10.1080/00085030.2002.10757540
- Chambers, J. C., Horvath, M. A. H., & Kelly, L. (2010). A Typology of Multiple-Perpetrator Rape. *Criminal Justice and Behavior*, 37(10), 1114–1139. doi: 10.1177/0093854810377971

- Cowen, S., & Thomson, J. (2008). A likelihood ratio approach to familial searching of large DNA databases. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 643–645. doi: 10.1016/j.fsigss.2007.10.196
- Cox, M. (1991). A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood. *Journal of Forensic Sciences*, 36(5), 1503–1511.
- da Silva, R. R., Agustini, B. C., da Silva, A. L. L., & Frigeri, H. R. (2012). Luminol in the forensic science. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(4), 172–177. doi: 10.20873/jbb.uft.cemaf.v3n4.rogiskisilva
- Denison, S. J., Lopes, E. M., D'Costa, L., & Newman, J. C. (2004). Positive prostate-specific antigen (PSA) results in semen-free samples. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 37(4), 197–206. doi: 10.1080/00085030.2004.10757576
- Diamandis, E. P., & Yu, H. (1997). Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *The Urologic Clinics of North America*, 24(2), 275–282. doi: 10.1016/s0094-0143(05)70373-6
- Dworkin, E. R., Menon, S. v., Bystrynski, J., & Allen, N. E. (2017). Sexual assault victimization and psychopathology: A review and meta-analysis. *Clinical Psychology Review*, 56, 65–81. doi: 10.1016/j.cpr.2017.06.002
- Elliott, K., Hill, D. S., Lambert, C., Burroughes, T. R., & Gill, P. (2003). Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides. *Forensic Science International*, 137(1), 28–36. doi: 10.1016/S0379-0738(03)00267-6
- Fiedler, A., Rehdorf, J., Hilbers, F., Johrdan, L., Stribl, C., & Benecke, M. (2008). Detection of Semen (Human and Boar) and Saliva on Fabrics by a Very High Powered UV-VIS-Light Source. *The Open Forensic Science Journal*, 1(1), 12–15. doi: 10.2174/1874402800801010012
- Fonneløp, A. E., Johannessen, H., Heen, G., Molland, K., & Gill, P. (2019). A retrospective study on the transfer, persistence and recovery of sperm and epithelial cells in samples collected in sexual assault casework. *Forensic Science International: Genetics*, 43, 102153. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.102153
- Gaensslen, R. (1983). Unit II- Identification of blood. In *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry* (pp. 71–145).
- Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., & Vasheghani-Farahani, E. (2010). Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. In *Polymer Journal* (Vol. 19, Issue 5). Retrieved from www.SID.ir

**Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

- Gill, P., Brenner, C. H., Buckleton, J. S., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W. R., Morling, N., Prinz, M., Schneider, P. M., & Weir, B. S. (2006). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Science International*, *160*(2–3), 90–101. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.04.009
- Gill, Peter, Jeffreys, A. J., & Werrett, D. J. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints.' *Nature*, *318*(6046), 577–579. doi: 10.1038/318577a0
- Gregório, I., García-Ruiz, C., & Martínez, P. (2019). Maximizing semen extraction from sanitary pads by chemical and shredding treatments. *Forensic Science International: Genetics*, *42*, 198–202. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.07.014
- Gross, A. M., Harris, K. A., & Kaldun, G. L. (1999). The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences*, *44*(4), 837–840. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/10432617>
- Hampton, H. L. (1995). Care of the woman who has been raped. *The New England Journal of Medicine*, *332*(4), 234–237. doi: 10.1056/NEJM199501263320407
- Han, J.-P., Yang, F., Xu, C., Wei, Y.-L., Zhao, X.-C., Hu, L., Ye, J., & Li, C.-X. (2014). A new strategy for sperm isolation and STR typing from multi-donor sperm mixtures. *Forensic Science International: Genetics*, *13*, 239–246. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.08.012
- Harbison, S., & Fleming, R. (2016). Forensic body fluid identification: state of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, *11*. doi: 10.2147/rrfms.s57994
- Henky, H., Budiningsih, Y., & Widiatmaka, W. (2011). The validity of rapid test to detect prostate-specific antigen (PSA) in seminal fluid. *Medical Journal of Indonesia*, *278*. doi: 10.13181/mji.v20i4.464
- Herr, J. C., Summers, T. A., Mcgee, R. S., Sutherland, W. M., Sigman, M., & Evans, R. J. (1986). *Characterization of a Monoclonal Antibody to a Conserved Epitope on Human Seminal Vesicle-Specific Peptides: A Novel Probe/Marker System for Semen Identification*.
- Hobbs, M. M., Steiner, M. J., Rich, K. D., Gallo, M. F., Warner, L., & Macaluso, M. (2010). Vaginal swab specimen processing methods influence performance of rapid semen detection tests: a cautionary tale. *Contraception*, *82*(3), 291–295. doi: 10.1016/j.contraception.2010.02.022
- Hochmeister, M. N., Budowle, B., Rudin, O., Gehrig, C., Borer, U., Thali, M., & Dirnhofer, R. (1999). Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for

- the forensic identification of seminal fluid. *Journal of Forensic Sciences*, 44(5), 1057–1060.
- Horsman, K. M., Barker, S. L. R., Ferrance, J. P., Forrest, K. A., Koen, K. A., & Landers, J. P. (2005). Separation of sperm and epithelial cells in a microfabricated device: Potential application to forensic analysis of sexual assault evidence. *Analytical Chemistry*, 77(3), 742–749. doi: 10.1021/ac0486239
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169. doi: 10.1067/mpr.2001.113778
- Jakubowska, J., Maciejewska, A., & Pawłowski, R. (2012). Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *International Journal of Legal Medicine*, 126(1), 173–178. doi: 10.1007/s00414-011-0590-5
- Jobling, M. A., Pandya, A., & Tyler-Smith, C. (1997). The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *International Journal of Legal Medicine*, 110(3), 118–124. doi: 10.1007/s004140050050
- Kapgate, K. S., Ghoti, C. B., Gaikawad, S. v., Apte, S. S., R.Pawar, R., & Thakare, V. J. (2019). Forensic Comparison of Condom as an Evidences Tool in Deciphered Sexual Assault Cases. *Chemical Science Transactions*, 8(3). doi: 10.7598/cst2019.1587
- Karadayi, S., Moshfeghi, E., Arasoglu, T., & Karadayi, B. (2020). Evaluating the persistence of laundered semen stains on fabric using a forensic light source system, prostate-specific antigen Semiquant test and DNA recovery-profiling. *Medicine, Science and the Law*, 60(2), 122–130. doi: 10.1177/0025802419896935
- Kayser, M. (2017). Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. In *Human Genetics* (Vol. 136, Issue 5, pp. 621–635). Springer Verlag. doi: 10.1007/s00439-017-1776-9
- Kearse, K. P. (2020). Ultraviolet 365 as an Alternative Light Source for Detection of Blood Serum. *Journal of Forensic Sciences*, 65(5), 1716–1721. doi: 10.1111/1556-4029.14439
- Kenna, J., Smyth, M., McKenna, L., Dockery, C., & McDermott, S. D. (2011). The Recovery and Persistence of Salivary DNA on Human Skin. *Journal of Forensic Sciences*, 56(1), 170–175. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01520.x
- Khaldi, N., Miras, A., Botti, K., Benali, L., & Gromb, S. (2004). TECHNICAL NOTE Evaluation of Three Rapid Detection Methods for the Forensic Identification of



**Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

- Seminal Fluid in Rape Cases. In *J Forensic Sci* (Vol. 49, Issue 4). Retrieved from [www.astm.org](http://www.astm.org)
- Kind, S. S. (1957). Issue 5 Article 12 Recommended Citation Stuart S. Kind, Use of the Acid Phosphatase Test in Searching for Seminal Stains, The, 47. In *Journal of Criminal Law and Criminology* (Vol. 47). Retrieved from <https://scholarlycommons.law.northwestern.edu/jclc>
- Krug, E. G., & World Health Organization. (2002). *World report on violence and health*. World Health Organization.
- Laitan, Á., Sawyer, I., Quinones, I., & Daniel, B. (2011). Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. *Medicine, Science and the Law*, 51(1), 11–17. doi: 10.1258/msl.2010.010040
- Laux, D. L., & Custis, S. E. (2004). *Forensic Detection of Semen III . Detection of PSA Using Membrane Based Tests : Sensitivity Issues with Regards to the Presence of PSA in Other Body Fluids*.
- Laux, L., Tambasco, A. J., & Benzinger, E. A. (2008). *Forensic Detection of Semen II*.
- Lewis, J., Baird, A., McAlister, C., Siemieniuk, A., Blackmore, L., McCabe, B., O'Rourke, P., Parekh, R., Watson, E., Wheelhouse, M., & Wilson, N. (2013). Improved detection of semen by use of direct acid phosphatase testing. *Science & Justice*, 53(4), 385–394. doi: 10.1016/j.scijus.2013.04.009
- Linden, J. A. (1999). *SEXUAL ASSAULT* (Vol. 17).
- Lundwall, Å., Bjartell, A., Olsson, A. Y., & Malm, J. (2002). Semenogelin I and II, the predominant human seminal plasma proteins, are also expressed in non-genital tissues. In *Molecular Human Reproduction* (Vol. 8, Issue 9).
- Luque, J. A. (2012). *Interpretation Guidelines for Mixed-STR Multilocus Electrophoretic Profiles* (pp. 213–229). doi: 10.1007/978-1-61779-461-2\_15
- Lynnerup, N., Hjalgrim, H., & Eriksen, B. (1995). Routine use of ultraviolet light in medicolegal examinations to evaluate stains and skin trauma. *Medicine, Science, and the Law*, 35(2), 165–168. doi: 10.1177/002580249503500211
- Magalhães, T., Dinis-Oliveira, R. J., Silva, B., Corte-Real, F., & Nuno Vieira, D. (2015). Biological Evidence Management for DNA Analysis in Cases of Sexual Assault. In *Scientific World Journal* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. doi: 10.1155/2015/365674
- Manello F., Condemi L., Cardinal A., Bianchi G., & G. Gazzanell. (1998). High Concentration of Prostate-Specific Antigen in Urine of Women Receiving Oral Contraceptives. *Clinical Chemistry*, 44.

- Martin, N. C., Clayson, N. J., & Scrimger, D. G. (2006). The sensitivity and specificity of Red-Starch paper for the detection of saliva. *Science & Justice*, 46(2), 97–105. doi: 10.1016/S1355-0306(06)71580-5
- Martínez, P., Santiago, B., Alcalá, B., & Atienza, I. (2015). Semen searching when sperm is absent. *Science and Justice*, 55(2), 118–123. doi: 10.1016/j.scijus.2015.01.008
- Martins, C., Lima, G., Carvalho, MR., Cainé, L., & Porto, MJ. (2015). DNA quantification by real-time PCR in different forensic samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e545–e546. doi: 10.1016/j.fsigss.2015.09.215
- McCloskey, K. L., Muscillo, G. C., & Noordewier, B. (1975). Prostatic acid phosphatase activity in the postcoital vagina. *Journal of Forensic Sciences*, 20(4), 630–636.
- McDonald, A., Jones, E., Lewis, J., & O'Rourke, P. (2015). Y-STR analysis of digital and/or penile penetration cases with no detected spermatozoa. *Forensic Science International: Genetics*, 15, 84–89. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.10.015
- McQueen, K., Murphy-Oikonen, J., Miller, A., & Chambers, L. (2021). Sexual assault: women's voices on the health impacts of not being believed by police. *BMC Women's Health*, 21(1). doi: 10.1186/s12905-021-01358-6
- Misencik, A., & Laux, D. L. (2007). *Validation Study of the Seratec HemDirect Hemoglobin Assay for the Forensic Identification of Human Blood*.
- Miteva, R., Yotov, S., Georgiev, P., & Fasulkov, I. (2006). DETERMINATION OF SPECIES SPECIFICITY OF PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN (PSA) IN SEMEN. *Trakia Journal of Sciences*, 4(3), 64–68. Retrieved from <http://www.uni-sz.bg>
- Nagar, R., & Msalati, A. A. (2013). Changes in Serum PSA During Normal Menstrual Cycle. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28(1), 84–89. doi: 10.1007/s12291-012-0263-2
- Old, J. B., Schweers, B. A., Boonlayangoor, P. W., & Reich, K. A. (2009). Developmental Validation of RSID™-Saliva: A Lateral Flow Immunochromatographic Strip Test for the Forensic Detection of Saliva. *Journal of Forensic Sciences*, 54(4), 866–873. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01055.x
- Old, J., Schweers, B. A., Boonlayangoor, P. W., Fischer, B., Miller, K. W. P., & Reich, K. (2012). Developmental validation of RSID™-Semen: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of human semen. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2), 489–499. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01968.x
- Owers, R., McDonald, A., Montgomerie, H., & Morse, C. (2018). A casework study comparing success rates and expectations of detecting male DNA using two

**Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

- different Y-STR multiplexes on vaginal swabs in sexual assault investigations where no semen has been detected. *Forensic Science International: Genetics*, 37, 1–5. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.07.016
- Pang, B C M, & Cheung, B. K. K. (2007). Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. *Forensic Science International*, 169(1), 27–31. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.07.021
- Pang, Benjamin C. M., & Cheung, B. K. K. (2008). Applicability of Two Commercially Available Kits for Forensic Identification of Saliva Stains. *Journal of Forensic Sciences*, 53(5), 1117–1122. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00814.x
- Parson, W., Niederstätter, H., Köchl, S., Steinlechner, M., & Berger, B. (2001). *FORENSIC SCIENCES When Autosomal Short Tandem Repeats Fail: Optimized Primer and Reaction Design for Y-chromosome Short Tandem Repeat Analysis in Forensic Casework* (Vol. 42, Issue 3). Retrieved from www.cmj.hr
- Peonim, V., Worasuwanarak, W., Sujirachato, K., Teerakamchai, S., Srisont, S., Udnoon, J., & Chudoung, U. (2013). Comparison between prostate specific antigen and acid phosphatase for detection of semen in vaginal swabs from raped women. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(6), 578–581. doi: 10.1016/j.jflm.2013.06.009
- Pinheiro, M. de F. (2010). Algumas perspectivas da identificação genética. In *Genética Forense- Perspectivas da Identificação Genética* (pp. 17–78).
- Pinheiro, M. de F. (2016). Criminalística biológica. In *Princípios de genética forense* (pp. 41–71). Imprensa da Universidade de Coimbra. doi: 10.14195/978-989-26-0957-7\_2
- Porto, M. J. A. (2016). Colheita e acondicionamento de amostras biológicas para identificação genética. In *Princípios de genética forense* (pp. 17–40). Imprensa da Universidade de Coimbra. doi: 10.14195/978-989-26-0957-7\_1
- Primorac, D. S. M. S. ; M. D. (2014). Basic Genetics and Human Genetic Variation. In *Forensic DNA Applications- An Interdisciplinary Perspective* (pp. 3–53).
- Prinz, M, Ishii, A., Coleman, A., Baum, H. J., & Shaler, R. C. (2001). Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. *Forensic Science International*, 120(3), 177–188. doi: 10.1016/s0379-0738(00)00467-9
- Prinz, Mechthild, & Sansone, M. (2001). *FORENSIC SCIENCES Y Chromosome-specific Short Tandem Repeats in Forensic Casework* (Vol. 42, Issue 3). Retrieved from www.cmj.hr

- Purps, J., Geppert, M., Nagy, M., & Roewer, L. (2015). Validation of a combined autosomal/Y-chromosomal STR approach for analyzing typical biological stains in sexual-assault cases. *Forensic Science International: Genetics*, *19*, 238–242. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.08.002
- Ramos González, B., Córdova Mercado, M., Salas Salas, O., Carlos Hernández Reyes, J., Guardiola Ramos, M., Solis Esquivel, E., Castellanos Aguilar, G., & Diaz Torres, P. (2020). Biological Evidence Analysis in Cases of Sexual Assault. In *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.82164
- Rao, A. R., Motiwala, H. G., & Karim, O. M. A. (2007). The discovery of prostate-specific antigen. *BJU International*, *0(0)*, 070902212121002-??? doi: 10.1111/j.1464-410X.2007.07138.x
- Roewer, L. (2009). Y chromosome STR typing in crime casework. In *Forensic Science, Medicine, and Pathology* (Vol. 5, Issue 2, pp. 77–84). doi: 10.1007/s12024-009-9089-5
- Ruiz, G. C. (2020). *International Journal of Forensic Sciences Committed to Create Value for Researchers Superabsorbent Sanitary Pads as Evidence in Sexual Aggression Cases Int J Forens Sci Superabsorbent Sanitary Pads as Evidence in Sexual Aggression Cases*. doi: 10.23880/ijfsc-16000214
- Schmidt, S., Franke, M., Lehmann, J., Loch, T., Stöckle, M., & Weichert-Jacobsen, K. (2001). Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 217 women. *Urology*, *57(4)*, 717–720. doi: 10.1016/s0090-4295(00)01093-1
- Sensabaugh, G. F. (1978). Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *Journal of Forensic Sciences*, *23(1)*, 106–115.
- Seratec®. (2006). *PSA In Body Fluids*.
- Sibille, I., Duverneuil, C., Lorin de la Grandmaison, G., Guerrouache, K., Teissière, F., Durigon, M., & de Mazancourt, P. (2002). Y-STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa. *Forensic Science International*, *125(2)*, 212–216. doi: [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00650-8](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00650-8)
- Stangegaard, M., Hjort, B. B., Hansen, T. N., Hoflund, A., Mogensen, H. S., Hansen, A. J., & Morling, N. (2013). Automated extraction of DNA from biological stains on fabric from crime cases. A comparison of a manual and three automated methods.

**Quantificação de ADN vs. determinação da natureza de material biológico: valorização de resultados em perícias de natureza sexual**

- Forensic Science International. Genetics*, 7(3), 384–388. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.12.009
- Swango, K. L., Hudlow, W. R., Timken, M. D., & Buoncristiani, M. R. (2007). Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Science International*, 170(1), 35–45. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.09.002
- Tobe, S. S., Watson, N., & Daéid, N. N. (2007). Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood, Their Specificity, Sensitivity, and Effect on High Molecular-Weight DNA. *Journal of Forensic Sciences*, 52(1), 102–109. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00324.x
- Turrina, S., Filippini, G., Atzei, R., Zaglia, E., & de Leo, D. (2008). Validation studies of rapid stain identification-blood (RSID-blood) kit in forensic caseworks. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 74–75. doi: 10.1016/j.fsigs.2007.10.166
- Vandenberg, N., & Oorschot, R. A. H. (2006). The Use of PollilightR in the Detection of Seminal Fluid, Saliva, and Bloodstains and Comparison with Conventional Chemical-Based Screening Tests. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2), 361–370. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00065.x
- Vennemann, M., Scott, G., Curran, L., Bittner, F., & Tobe, S. S. (2014). Sensitivity and specificity of presumptive tests for blood, saliva and semen. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 10(1), 69–75. doi: 10.1007/s12024-013-9515-6
- Verma, H. (2022). Benzidine color-crystal test; modified test to confirm the presence of blood stain. *Forensic Science International*, 335, 111313. doi: 10.1016/j.forsciint.2022.111313
- Vermeulen, M., Wollstein, A., van der Gaag, K., Lao, O., Xue, Y., Wang, Q., Roewer, L., Knoblauch, H., Tyler-Smith, C., de Knijff, P., & Kayser, M. (2009). Improving global and regional resolution of male lineage differentiation by simple single-copy Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms. *Forensic Science International. Genetics*, 3(4), 205–213. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.01.009
- Vuichard, S., Borer, U., Bottinelli, M., Cossu, C., Malik, N., Meier, V., Gehrig, C., Sulzer, A., Morerod, M. L., & Castella, V. (2011). Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: A Swiss collaborative study. *Investigative Genetics*, 2(1). doi: 10.1186/2041-2223-2-11

- Wahed, A., & Dasgupta, A. (2019). Pitfalls in testing for common tumor markers. In *Accurate Results in the Clinical Laboratory* (pp. 191–211). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-813776-5.00012-1
- Wira, C. R., Grant-Tschudy, K. S., & Crane-Godreau, M. A. (2005). Epithelial Cells in the Female Reproductive Tract: a Central Role as Sentinels of Immune Protection. *American Journal of Reproductive Immunology*, 53(2), 65–76. doi: 10.1111/j.1600-0897.2004.00248.x
- Wornes, D. J., Speers, S. J., & Murakami, J. A. (2018). The evaluation and validation of Phadebas® paper as a presumptive screening tool for saliva on forensic exhibits. *Forensic Science International*, 288, 81–88. doi: 10.1016/j.forsciint.2018.03.049
- Yoshida, K., Sekiguchi, K., Mizuno, N., Kasai, K., Sakai, I., Sato, H., & Seta, S. (1995). Forensic Science International The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. In *Forensic Science International* (Vol. 72).
- Yu, H., & Berkel, H. (1999). Prostate-specific antigen (PSA) in women. *The Journal of the Louisiana State Medical Society: Official Organ of the Louisiana State Medical Society*, 151(4), 209–213.
- Yu, H., & Diamandis, E. P. (1995). Prostate-specific antigen in milk of lactating women. *Clinical Chemistry*, 41(1), 54–58.
- Yu, He, & Diamandis', E. P. (1995). Prostate-Specific Antigen Immunoreactivity in Amniotic Fluid. In *CLINICAL CHEMISTRY* (Vol. 41, Issue 2).
- Zohuriaan-Mehr, M. J., & Kabiri, K. (2008). Superabsorbent Polymer Materials: A Review. In *Polymer Journal* (Vol. 17, Issue 6). Retrieved from www.SID.ir