

# **CORRELAÇÃO ENTRE PESQUISA DE ESPERMATOZÓIDES E ANÁLISE QUALITATIVA DO ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA) COMO FERRAMENTA NA PRÁTICA FORENSE**

Fernanda do Carmo Rodrigues Alves

Ian Marques Cândido

Keiti Machado de Borba

Luciano Figueiredo de Souza

Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues  
Secretaria de Segurança Pública do Estado de Goiás

## **RESUMO**

O número de exames forenses relacionados a vítimas de casos de estupro está aumentando constantemente. A identificação do sêmen é de extrema importância na investigação destes casos e outros crimes sexuais. O procedimento mais comum, utilizado para identificação de sêmen, é a detecção citológica do espermatozóide. O Antígeno Prostático Específico (PSA) é uma glicoproteína produzida pelo tecido da próstata e secretada no plasma seminal. O PSA é utilizado como um biomarcador de câncer e como marcador forense na detecção da presença de fluido seminal. Neste estudo foram avaliadas duzentos e sessenta e três amostras de suabes e outras peças através de testes de PSA em membranas imunocromatográficas. Os resultados indicam que este método pode ser utilizado para identificar a presença de sêmen em amostras forenses e apresenta nível de concordância maior que 85% com a pesquisa citológica de espermatozóide.

## **ABSTRACT**

The number of forensic examinations concerning rape victims is constantly increasing. The identification of semen is of extreme importance in the investigation of this cases and other sexual crimes. The most commonly used procedure for semen identification is the cytological detection of spermatozoa. The Prostate specific antigen (PSA) is a glycoprotein produced by the prostatic gland and secreted into seminal plasma. The PSA is used as a cancer biomarker and as a forensic marker in the detection of presence of seminal fluid. In this study was evaluated two hundred and sixty three samples of swabs e other pieces by immunochromatographic PSA membrane tests. The results indicate that this method can be used to identify the presence of semen in forensic samples and show agreement level most of 85% with cytological sperm research.

## 1. INTRODUÇÃO

A violência sexual é uma questão histórica e cultural que afeta crianças, adolescentes e adultos, independente de cor, religião, etnia, nacionalidade, opção sexual ou condição social (FERREIRA e SCHRAMM, 2000). Atinge, principalmente, mulheres jovens em idade reprodutiva que ao pedirem ajuda, seja no âmbito da justiça ou da saúde, muitas vezes estão sujeitas ao preconceito, julgamento e intolerância, fatores que dificultam o conhecimento acerca da prevalência deste tipo de violência na população. Estima-se que menos de 20% destes crimes chegam ao conhecimento das autoridades (CAMARGO, 2000).

No Brasil, não há dados precisos a respeito da incidência de crimes sexuais. Dados epidemiológicos estimam que os registros das delegacias correspondam em média, de 10 a 20% dos casos que realmente acontecem na população (BEDONE & FAÚNDES, 2007).

Os recentes avanços do conhecimento na área de imunologia e biologia molecular têm proporcionado uma nova visão e compreensão das doenças e permitido o desenvolvimento de novas metodologias no campo diagnóstico. Técnicas laboratoriais, com um alto fundamento teórico e aplicado, têm permitido uma interpretação mais adequada dos diagnósticos e auxiliado na elucidação de diversas doenças (PINHO, 2005).

Na prática forense, a fosfatase ácida prostática (FAP) foi bastante utilizada na investigação e caracterização do líquido seminal. Porém, foi considerado um marcador de sensibilidade e especificidade limitado, entrando em desuso após a descoberta do PSA (do inglês: *Prostate-Specific Antigen*), (OESTERLING *et al.*, 1987; KHALDI *et al.*, 2004).

O antígeno prostático específico (PSA) descoberto por Hara *et al.*, (1971), foi denominado inicialmente como uma gamasemiproteína. O PSA é uma glicoproteína de cadeia simples, peso molecular entre 33- 34 kDa e expresso em altos níveis no epitélio prostático humano (WANG, 1979). Sensabaugh, (1978) caracterizou uma proteína do plasma seminal, denominada p30 (peso molecular: 30 kDa) e esta apresentava imunoreatividade com o anti-soro preparado contra uma proteína E1, sugerindo alguns determinantes imunológicos em comum. A concentração do PSA no esperma varia de 0,2 até  $5,5 \times 10^6$  ng/mL e é um milhão de vezes maior que no soro de homens normais (SAWAYA & ROLIM, 2003). Os níveis de PSA aumentam no soro de indivíduos com patologia prostática e têm sido utilizados na detecção precoce de progressão ou recorrência de neoplasia da próstata e também no acompanhamento de pacientes após terapia sistêmica, cirúrgica ou radioterápica (SHARIAT *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2007)

Wang *et al.*, (1982), Graves *et al.*, (1990), Sensabaugh & Blake, (1990) e Johnson & Kotowski (1993) sugeriram que o PSA era bioquimicamente idêntico à p30. O PSA (ou p30) faz parte da família das calicreínas, proteases do soro com diversas funções fisiológicas. A denominação PSA refletia a idéia inicial de que a expressão da proteína era restrita à próstata, mas sua presença no líquido seminal em altas concentrações, quando comparada ao soro humano, o caracterizou como um importante marcador na prática forense, permitindo a identificação e caracterização do fluido seminal em evidências criminais deixadas por indivíduos vasectomizados, azoospermicos ou oligospermicos, casos onde pode não ser possível detectar a presença de espermatozoides por avaliação microscópica. (SENSABAUGH, 1978; KOTOWSKI, 1993; HOCHMEISTER *et al.*, 1999).

A presença do PSA não está restrita apenas ao epitélio prostático. Estudos recentes relataram a presença do PSA em fluidos extra-prostáticos, como no soro de mulheres e crianças, urina de mulheres, líquido amniótico, leite materno, saliva e líquido cefalorraquidiano (LAUX & CUSTIS, 2003). Porém, segundo Sawaya e Rolim, (2004), os níveis de PSA existentes em fluidos extra-prostáticos não interferem no valor da pesquisa de PSA na investigação do líquido seminal em perícias criminais, permitindo seu uso como marcador na determinação dos vestígios de esperma coletados das vítimas, preservativos e a partir de manchas obtidas em peças de vestuário.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a correlação entre os casos concordantes e discordantes da análise laboratorial de PSA e pesquisa de espermatozoides em vítimas de violência sexual, no período de janeiro de 2006 a julho de 2007, no Laboratório de Biologia, do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues (ICLR) da Secretaria de Segurança Pública do Estado de Goiás, visando verificar a utilidade da técnica de pesquisa de PSA como marcador da presença de sêmen.

## **2. DESENVOLVIMENTO**

Foram selecionados, aleatoriamente, para realização deste estudo, duzentos e sessenta e três (263) casos de perícias encaminhadas para realização de Pesquisa de Espermatozoides, as quais foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia do ICLR no período de janeiro de 2006 a julho de 2007. Paralelamente, estas amostras foram submetidas à Pesquisa de PSA, a fim de se comparar o nível de concordância entre as duas técnicas.

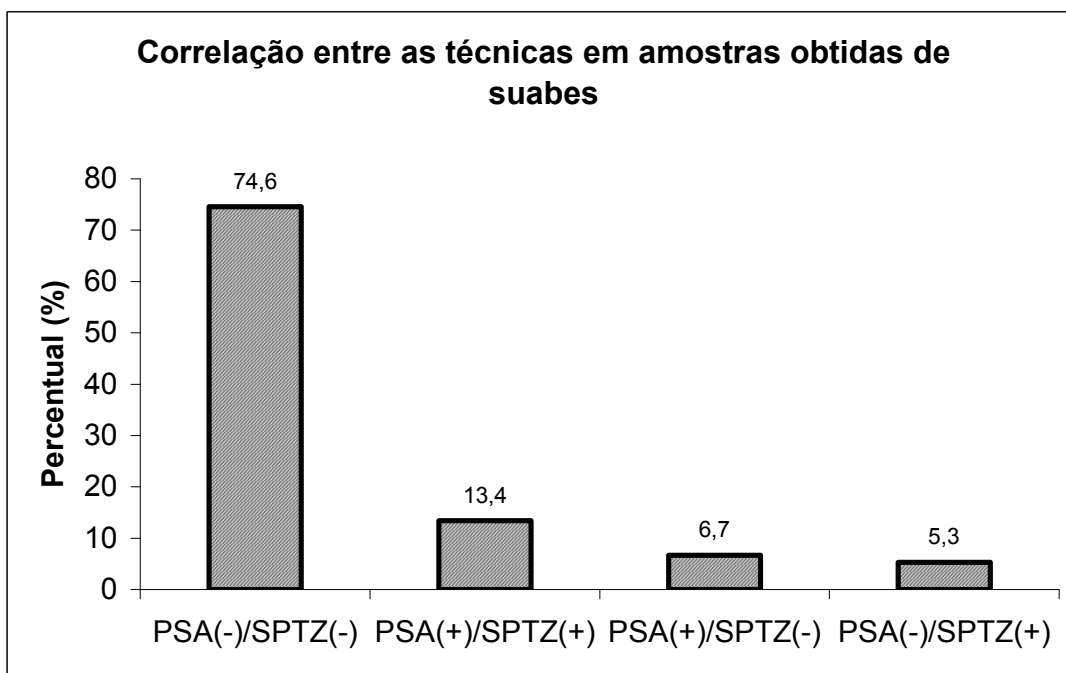
Amostras de vestuário e de outros objetos contendo secreções biológicas (preservativos, compressa de gaze, fralda, absorvente íntimo, lençol e toalha) foram denominadas como peças. As amostras biológicas impregnadas em suabes eram de secreção vaginal, vulvar, anal, perianal e oral. Do total de 263 perícias examinadas, 209 eram de suabes e 54 de peças. As peças e os suabes contendo secreção biológica foram processados e analisados segundo os protocolos experimentais acreditados pelo próprio laboratório.

A avaliação citológica da pesquisa de espermatozóide foi realizada a partir de esfregaços em lâminas, e posteriormente corados utilizando metodologia de coloração diferencial rápida. A análise das lâminas foi feita por microscopia óptica.

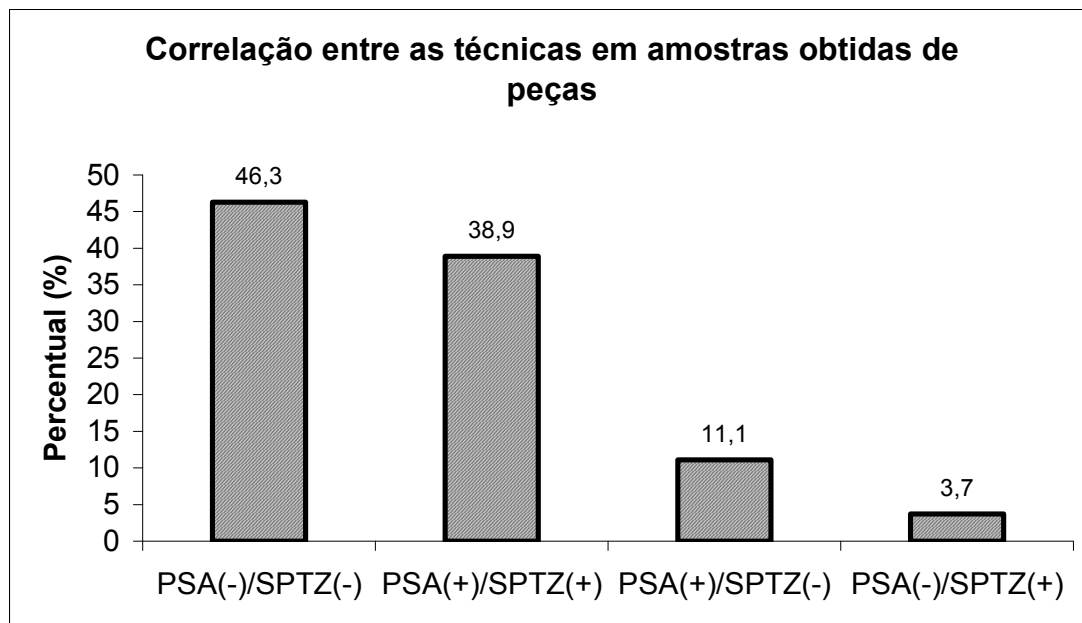
Para a determinação da presença de PSA nas amostras periciadas, foi utilizado teste imunocromatográfico, que detecta qualitativamente a presença de PSA em soro humano e em fluidos corporais em quantidades superiores a 4 ng/mL.

Para extração da amostra na realização do ensaio foi utilizado cerca de 1 mL de água destilada tanto para suabes quanto para peças, sendo, o extrato obtido, aplicado (150 µL) na placa de PSA juntamente com um ensaio controle (branco) utilizando somente água destilada.

Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas da ferramenta Excel<sup>®</sup> (2003) para o tratamento dos dados e confecção dos gráficos (figuras expositivas).



**Figura 01.** Avaliação dos resultados concordantes e discordantes, correlacionando pesquisa de PSA e análise citológica da presença de espermatozóide (SPTZ) em suabes.



**Figura 02.** Avaliação dos resultados concordantes e discordantes, correlacionando pesquisa de PSA e análise citológica da presença de espermatozóide (SPTZ) em peças.

Observa-se na figura 01 uma significativa predominância de resultados concordantes, 88% (184/209) entre a pesquisa de PSA e espermatozoides em amostras biológicas obtidas a partir de suabes. Nas secreções obtidas a partir de peças, a concordância entre as técnicas foi de 85,2% (46/59), conforme apresentado na figura 02. Como os índices de concordância nas amostras obtidas de suabes e peças foram semelhantes, percebe-se que o suporte onde se encontrava o material biológico não influenciou o resultado das análises.

Dos 263 casos de perícia examinados, 20 casos foram discordantes, com resultado de pesquisa de PSA positiva e pesquisa de espermatozóide negativa (figuras 1 e 2). A sensibilidade da técnica de microscopia depende de diversos fatores como presença de estruturas obscurecedoras (fungos e sobreposição de células escamosas), qualidade dos equipamentos e corantes e da quantidade de espermatozoides na amostra. Teixeira *et al.*, (1998) relatam o desconhecimento no Brasil da coloração de *Christmas Tree* e a vantagem desta metodologia pelo fácil reconhecimento dos espermatozoides o que poderia diminuir os casos falso-negativos.

Resultados falso-negativos na pesquisa de PSA por imunocromatografia podem ocorrer devido ao excesso de PSA, causando o efeito *hook*, no qual o PSA livre em excesso chegará à zona de reação antes do conjugado, não desenvolvendo assim, cor na região teste (SAWAYA & ROLIM, 2003).

Análises forenses têm uma característica peculiar quanto à conservação das amostras, pois estão sujeitas à degradação por ação ambiental, enzimática, física e/ou microbiana. Como a molécula do PSA é uma glicoproteína, também pode sofrer degradação, resultando em casos falso-negativos, principalmente em peças com manchas antigas de esperma e em suabes com secreção coletada de vítimas que têm um prolongado tempo entre o intercurso e a procura pelo serviço do Instituto Médico Legal (IML). Johnson & Kotowski, (1993) perceberam resultados falso-negativos para pesquisa de PSA em amostras contaminadas com detergente. Espera-se que este tipo de resultado aconteça com certa frequência, já que a primeira reação normalmente observada nas vítimas de violência sexual é fazer higiene íntima.

A quantidade de água destilada adicionada à amostra no momento da extração das secreções, de peças ou de suabes, pode diluir a quantidade de PSA a níveis não detectáveis, dependendo da técnica. A imunocromatografia como teste qualitativo de PSA tem a sensibilidade de 4 ng/mL. Testes imunoenzimáticos, como ELISA, são sugeridos por diversos autores na prática forense, por possuírem uma sensibilidade maior em relação à imunocromatografia (JOHNSON & KOTOWSKI, 1993; HOCHMEISTER *et al.*, 1999; SIMICH *et al.*, 1999; LEVINE *et al.*, 2004).

### **3. CONCLUSÃO**

Diante dos dados obtidos no presente estudo, conclui-se que a análise qualitativa do PSA é uma importante ferramenta de auxílio-diagnóstico na prática forense, corroborando o resultado final do laudo laboratorial da investigação e caracterização do líquido seminal em diversas fontes biológicas. Os exames laboratoriais sofrem influência principalmente das condições das amostras. Dessa forma, apesar do reconhecido valor científico do PSA como marcador da presença de líquido seminal, os resultados não devem ser analisados isoladamente. Portanto, a avaliação microscópica adicionada à análise qualitativa do PSA, são ferramentas potenciais na elucidação de casos de violência sexual.

#### **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**BEDONE, A.J., FAÚNDES, A. Atendimento integral às mulheres vítimas de violência sexual: Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, fev, 2007; 23(2): 465-469.

**CAMARGO, M. Violência e saúde: ampliando políticas públicas.** J Redesaúde, 2000; 22:6-8.

**DREZETT, J. Aspectos médicos do abuso sexual contra crianças e adolescentes. Compreendendo a violência sexual em uma perspectiva multidisciplinar.** Carapicuíba: Fundação Orsa Criança e Vida, 2002; 50-66.

**ELLSBERG, M., HEISE, L. Researching violence against women: a practical guide for researchers and activists.** Washington, DC7 Program for Appropriate Technology in Health, World Health Organization, 2005.

**FERREIRA, A.L., SCHRAMM, F.R. Implicações éticas da violência doméstica contra a criança para profissionais de saúde.** Rev. Saúde Pública, 2000; 34(6): 659-65.

**FINKELHOR, D. The international epidemiology of child sexual abuse.** Child Abuse Neglect. 1994; 18: 409-17.

**GRAVES, H.C., KAMAREI, M., STAMEY, T.A. Identity of prostate specific antigen and the semen protein P30 purified by a rapid chromatography technique.** Journal Urology, 1990; 144 (6): 1510-1515.

**HARA, M., INORRE, T., FUKUYAMA, T. Some physico-chemical characteristics of gamma-seminoprotein, an antigenic component specific for human seminal plasma.** Japan, Journal Legal Medicine, 1971; 25: 322-326.

**HOCHMEISTER, M.N., et al. Evaluation of Prostatic-Specific Antigen (PSA) Membrane Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid.** Journal of Forensic Science, 1999; 44:1057-1060.

JOHNSON, E.D., KOTOWSKI, T.M. **Detection of Prostate Specific Antigen by ELISA.** Journal of Forensic Sciences, 1993; 38( 2): 250-258.

KHALDI, N., MIRAS, A., BOTTI, K., BENALI, L., GROMB, S. **Evaluation of three rapid detection methods for the forensic identification of seminal fluid in rape cases.** Journal Forensic Sciences, 2004; 49(4): 749-53.

LEVINE, B., TITUS, J.M., MOORE, K., FOWLER, D. **Use of prostate specific antigen in the identification of semem in postmortem cases.** Journal Forensic Medical Pathology, 2004; 25(4): 288-90.

LAUX, D.L., CUSTIS, S. **Forensic Detection of Semen III. Detection of PSA using membrane based tests: sensivity issues with regards to the presence of PSA in other body fluids.** Ohio Bureau of Criminal Identification, 2003.

OESTERLING, J.E., BRENDLER, C.B., EPSTEIN J.I., KIMBALL A.W.J.R., WALSH, P.C. **Correlation of clinical stage, serum prostatic acid phosphatase and preoperative Gleason grade with final pathological stage in 275 patients with clinically localized adenocarcinoma of the prostate.** Journal Urology, 1987; 138: 92-8.

PINHO, M.S.L. **Imunoistoquímica: O Estudo da Biologia Molecular ao Alcance de Todos.** Revista Brasileira de Coloproctologia, 2005; 25(2): 188-191.

SAFFIOTTI, H.I.B., ALMEIDA, S.S. **Violência de gênero: poder e impotência.** Rio de Janeiro, Reinveinter, 1995.

SHARIAT, S.F., *et. al.* **Beyond Prostate-Specific Antigen: New Serologic Biomarkers for Improved Diagnosis and Management of Prostate Cancer.** Journal Urology, 2004; 6(2): 58-72.

SAWAYA, M.C.T., ROLIM, M.R.S. **Antígeno específico da próstata em fluidos biológicos: Aplicação forense.** Visão Acadêmica, Curitiba, 2004; 5: 109-116.

SAWAYA, M.C.T., ROLIM, M.R.S. **Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório.** Juruá, Curitiba, 2003; (2): 55-63.

SENSABAUGH, G.F. **Isolation and Characterization of a Semen-Specific Protein from Human Seminal Plasma: A Potential New Marker for Semen Identification.** Journal of Forensic Sciences, 1978; 23: 106-115.

SENSABAUGH, G.F., BLAKE, E.T. **Seminal Plasma Protein p30: Simplified Purification and Evidence for Identity with Prostate Specific Antigen.** Journal of Urology, 1990; 144: 1523-1526.

SIMICH, J.P., MORRIS, S.L., KLICK, R.L., RITTENHOUSE, D.K. **Validation of the Use of a Commercially Available Kit for the Identification of Prostate Specific Antigen (PSA) in Semen Stains.** Journal of Forensic Sciences, 1999; 44 (6): 1229-1231.

TEIXEIRA, W.R.G., PACCA, G.J.P., LIMA, L., TEIXEIRA, C.M.P., OLIVEIRA, P.M.A. **Técnica de coloração *Christmas tree* para o achado de espermatozóides em amostras de vítimas de estupro.** *Laes & Haes*, 1998; 113: 120-128.

THOMPSON, I.M., ANKERST, D.P. **Prostate-specific antigen in the early detection of prostate cancer.** *CMAJ*, 2007; 176: 13.

WANG, M.C., *et. al.* **A simplified purification procedure for human prostate antigen.** *Oncology*, 1982; 39: 1-5.

WANG, M.C., *et. al.* **Purification of a human prostate specific antigen.** *Invest Urology*, 1979; 17: 159-163.