



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

**CRISTINA WINKLER**

**DETECÇÃO DE DNA MASCULINO EM AMOSTRAS DE  
CRIMES SEXUAIS POR PCR EM TEMPO REAL**

VITÓRIA, ES

2024

**CRISTINA WINKLER**

**DETECÇÃO DE DNA MASCULINO EM AMOSTRAS DE CRIMES  
SEXUAIS POR PCR EM TEMPO REAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Iuri Drumond Louro

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Dummer Meira

Vitória, ES

2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

W775 Winkler, Cristina, 1991-  
d Detecção de DNA masculino em amostras de crimes sexuais por PCR em tempo real / Cristina Winkler. - 2024.  
62 f. : il.

Orientador: Iuri Drumond Louro.  
Coorientadora: Débora Dummer Meira.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Genética Forense. I. Louro, Iuri Drumond. II. Meira, Débora Dummer. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Ata da 228ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **CRISTINA WINKLER**, realizada às dez horas do dia catorze de março de dois mil e vinte e quatro. A sessão pública foi realizada em formato virtual, por meio do Google Meet (<https://meet.google.com/htt-axam-noo>). O presidente da Banca, Prof. Dr. Iuri Drumond Louro (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Débora Dummer Meira, coorientadora; Eldamária de Vargas Wolfgramm dos Santos, membro interno e Elizeu Fagundes de Carvalho - Universidade Estadual do Rio de Janeiro, membro externo. Em seguida, passou a palavra à aluna que apresentou a sua proposta de dissertação intitulada **“DETECÇÃO DE DNA MASCULINO EM AMOSTRAS DE CRIMES SEXUAIS POR PCR EM TEMPO REAL”**. Terminada a apresentação, o presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. Em seguida, o presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a Dissertação havia sido **APROVADA** e que a aluna deve providenciar dentro do período de 60 dias, a versão final da Dissertação. O Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e lavrou a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 14 de março de 2024.

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro  
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profª Drª Débora Dummer Meira  
Universidade Federal do Espírito Santo - Coorientadora

Profª Drª Eldamária de Vargas Wolfgramm dos Santo  
Universidade Federal do Espírito Santo – Membro interno

Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro – Membro externo

Documento assinado digitalmente



ELIZEU FAGUNDES DE CARVALHO  
Data: 21/03/2024 11:50:27-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
IURI DRUMOND LOURO - SIAPE 1360120  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 14/03/2024 às 11:51

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/893705?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
ELDAMARIA DE VARGAS WOLFGRAMM DOS SANTOS - SIAPE 3026695  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 14/03/2024 às 15:18

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/893974?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
DEBORA DUMMER MEIRA - SIAPE 2020030  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 22/03/2024 às 10:03

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/899433?tipoArquivo=O>

**CRISTINA WINKLER**

**DETECÇÃO DE DNA MASCULINO EM AMOSTRAS DE CRIMES  
SEXUAIS POR PCR EM TEMPO REAL**

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

Apresentada em 14 de março de 2024.

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

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Dummer Meira  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientadora

Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro  
Examinador Externo

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eldamária de Vargas  
Wolfgramm dos Santos  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinadora Interna

VITÓRIA, ES

2024

## **AGRADECIMENTOS**

À Raquel Reis um agradecimento especial por toda ajuda durante o projeto, pelos conhecimentos técnicos compartilhados, pelos sábios conselhos e por atender todas as minhas demandas com um sorriso no rosto. Foi um privilégio conhecer você;

Aos colegas do Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) por toda assistência ao longo desses dois anos, desde o desenvolvimento teórico do projeto a parte prática;

Aos professores Drs. Iuri Drumond Louro e Débora Dummer Meira pela orientação, pela oportunidade e pela confiança;

Aos professores Drs. Elizeu Fagundes de Carvalho, Eldamária de Vargas Wolfgramm dos Santos, Leonor Gusmão e Flavia de Paula pela composição da banca examinadora desta dissertação;

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Biologia e Toxicologia Forense do ES pela cooperação e parceria, em especial à Brenda que me ajudou de todas as formas desde o início;

Aos amigos e colegas do Laboratório de DNA Forense do ES pela ajuda e pela compreensão nos momentos de ausência. Um agradecimento especial ao Victor e ao Lucas pelas dicas, ideias e conhecimentos compartilhados;

Ao Pedro por ser a pessoa que eu mais posso contar, por tornar meus dias mais leves, pelo amor, pelas risadas e por me ajudar com as análises estatísticas deste projeto;

À minha família por todo apoio, incentivo e torcida, vocês são meu exemplo de dedicação e determinação;

Ao Nando, meu sobrinho afillhado, meu amor, pelo sorriso mais doce que me fez esquecer o cansaço e as angústias do momento;

Às melhores amigas que alguém poderia ter “Since 2006” pelo incentivo, pelas palavras acolhedoras e pelos momentos de alegria compartilhados;

À Polícia Civil do Espírito Santo por ter disponibilizado as amostras utilizadas neste trabalho;

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao NGHM e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela possibilidade de desenvolver esse trabalho;

Por fim, agradeço à agência de financiamento FAPES (Edital FAPES Nº 03/2021 - Universal).

## RESUMO

WINKLER, C. **Detecção de DNA masculino em amostras de crimes sexuais por PCR em Tempo Real**. 2024. 62f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo, 2024.

A inserção de perfis genéticos em bancos de dados de DNA revolucionou a investigação de crimes sexuais. Antes dessa ferramenta, só era possível investigar casos com agressores sexuais conhecidos. No Brasil, o uso de bancos de dados de DNA é recente, e, por isso, o processamento de amostras de casos sem suspeitos não era considerado importante até então. Por essa razão, os laboratórios forenses de DNA brasileiros têm uma grande quantidade de vestígios não analisadas. Nesse contexto, aumentar o número de perfis genéticos inseridos nos bancos de dados pode contribuir para reduzir esses atrasos e resolver casos antigos. No entanto, as práticas atuais de análise de DNA geralmente se concentram em casos em que o sêmen está presente e, na maioria dos casos, esse material biológico não é detectado. A PCR em Tempo Real é uma técnica com alta sensibilidade, especificidade e já amplamente utilizada na rotina das análises forense. Assim, este projeto teve como objetivo avaliar a viabilidade técnica da PCR em Tempo Real como um método de triagem de material biológico masculino em amostras de suabes de mulheres vítimas de agressão sexual. Após testes de rotina para triagem de esperma no Laboratório de Biologia Forense da Polícia Civil do Espírito Santo, 176 amostras de suabes foram analisadas usando quatro diferentes ensaios de PCR em Tempo Real. Foi realizada a quantificação de DNA usando um *kit* comercial com sondas TaqMan e três diferentes reações de qPCR-duplex *in house* com corante SYBR Green. No ensaio de quantificação de DNA, entre as 84 amostras com resultados negativos para a triagem de sêmen, 39 (46,4%) apresentaram DNA masculino. Os três ensaios de qPCR-duplex baseados em SYBR Green não mostraram a mesma sensibilidade que a quantificação de DNA com sondas TaqMan. Este estudo demonstrou que o uso da PCR em Tempo Real pode ser uma ferramenta robusta para detectar o DNA masculino como um método de triagem para identificar o contato masculino em casos de agressão sexual.

Palavras-chave: cromossomo Y. Triagem de sêmen. *Backlog* de vestígios de crime sexuais. Genética forense.

# DETECTION OF MALE DNA IN SEXUAL ASSAULT SAMPLES BY REAL-TIME PCR

## ABSTRACT

WINKLER, C. **Detection of male DNA in sexual assault samples by real-time PCR.** 2024. 62f. Dissertation (master's in biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Program, UFES, Espírito Santo. 2024.

The insertion of genetic profiles in DNA databases revolutionized the investigation of sexual assault. Before this turning point, it was only possible to investigate cases with known sexual offenders. In Brazil, the use of DNA databases is recent, and, therefore, the processing of samples of cases without a suspect were not considered important until then. For this reason, Brazilian forensic DNA laboratories have a large amount of unanalyzed traces. In this context, increasing the number of genetic profiles inserted into databases can contribute to reducing these backlogs and solving cold cases. However, current DNA analysis practices typically focus on cases where semen is detected. In instances where screening yields negative results, the forensic analysis often concludes and, in most cases, seminal fluid is not detected. Real-time PCR is a technique with high sensitivity and specificity and is already widely used in forensic laboratories. Thus, this project aimed to evaluate the technical feasibility of real-time PCR as a screening method for male fluids in swab samples from women who are victims of sexual assault. After routine testing for semen screening at the Forensic Biology Laboratory of Civil Police of Espírito Santo, 176 swab samples were analyzed using four different qPCR assays. It was performed DNA quantification using a commercial *kit* with TaqMan probes and three different *in house* qPCR-duplex reactions with SYBR Green dye. In the DNA quantification assay, among the 84 samples with negative results for semen screening, 39 (46.4%) presented male DNA, a significant proportion often overlooked by most Brazilian forensic laboratories. The three SYBR Green-based qPCR-duplex assays did not show the same sensitivity as DNA quantification with TaqMan probes. This study demonstrated that the use of real-time PCR can be a robust tool for detecting Y DNA as a screening method to identify male contact in cases involving sexual assault.

Key words: Y chromosome. Semen screening. DNA backlog. Forensic genetics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de <i>melting</i> dos produtos amplificados na reação <i>TSPY67/STS95</i> (Duplex 1) .....	33
Figura 2. Curva de <i>melting</i> dos produtos amplificados na reação <i>TSPY119/STS89</i> (Duplex 2) .....	33
Figura 3. Curva de <i>melting</i> dos produtos amplificados na reação <i>STS158/STS89</i> (Duplex 3) .....	34
Figure 4. Espermatozoide e células epiteliais sob microscopia óptica em ampliação de 400x .....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de <i>primers</i> utilizados nas reações de qPCR-duplex .....	29
Tabela 2. Lista das sequências dos <i>primers</i> utilizados .....	30
Tabela 3. Resultados da quantificação e da detecção de DNA masculino por PCR em Tempo Real em relação à triagem de semen .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMELX	Gene da amelogenina localizada no cromossomo X
AMELY	Gene da amelogenina localizada no cromossomo Y
Art.	Artigo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DML	Departamento Médico-Legal
ES	Espírito Santo
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCES	Polícia Civil do Espírito Santo
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )
PSA	Antígeno prostático específico (do inglês <i>prostate-specific antigen</i> )
qPCR	PCR em Tempo Real (do inglês <i>real-time PCR</i> )
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
RIBPG	Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos
SC	Citologia de espermatozóides (do inglês <i>sperm cytology</i> )
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
SRY	Gene da região de determinação sexual do cromossomo Y (do inglês <i>Sex-Determining Region of the Y chromosome</i> )

STR	Repetições curtas em tandem (do inglês <i>short tandem repeats</i> )
STS	Gene da sulfatase esteroide (do inglês <i>steroid sulfatase</i> )
STSP1	Pseudogene 1 da sulfatase esteroide (do inglês <i>steroid sulfatase microsomial pseudogene 1</i> )
TSPY	Proteína específica de testículo ligada ao Y (do inglês <i>testis-specific protein, Y-linked</i> )
UDG	Uracil-DNA glicosilase (do inglês <i>Uracil-DNA glycosylase</i> )
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
VNTR	Repetições em Tandem de Número Variável (do inglês <i>variable number of tandem repeats</i> )
WHO	World Health Organization
bp	Base pairs
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
ng	Nanograma
ng/µL	Nanograma por microlitro
pb	Pares de base
pg	Picograma
SPTZ	Espermatozoide(s)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 A VIOLÊNCIA SEXUAL CONTEXTUALIZADA</b> .....	14
<b>1.2 ATUAÇÃO DA PERÍCIA CRIMINAL NOS CRIMES DE ESTUPRO</b> .....	15
<b>1.3 GENÉTICA FORENSE</b> .....	17
<b>1.4 MARCADORES GENÉTICOS DO CROMOSSOMO Y</b> .....	19
<b>1.5 JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	23
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO (FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO)</b> .....	24
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A VIOLÊNCIA SEXUAL CONTEXTUALIZADA

A violência sexual representa um assunto alarmante no âmbito de saúde e segurança pública, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Dos crimes contra a liberdade sexual, o estupro é definido como “constranger alguém, mediante violência ou grave ameaça, a ter conjunção carnal ou a praticar ou permitir que com ele se pratique outro ato libidinoso” no Art. 213 do Código Penal Brasileiro.

Os crimes sexuais geram impactos significativos na saúde física e mental das vítimas, no curto e longo prazo. Na esfera de saúde física, as consequências podem incluir lesões nos órgãos genitais, a contração de infecções sexualmente transmissíveis (IST), gestações indesejadas e abortos ilegais. Em relação à saúde mental, o trauma resultante do estupro pode desencadear diversos transtornos, tais como depressão, síndrome de estresse pós-traumático, disfunções sexuais e até tentativas de suicídio (WHO, 2010; Ipea, 2014).

No Brasil, em 2022, o número absoluto de casos registrados de estupro e estupro de vulnerável foi de 74.930 e, dentre esses, 75,8% foi estupro de vulnerável, pessoas incapazes de consentir, ou pela idade (menores de 14 anos), ou por qualquer outro motivo (deficiência, enfermidade etc.). Além disso, os dados apontam que as vítimas eram 88,7% do sexo feminino e 11,3% do sexo masculino. Em relação aos agressores, 82,7% eram conhecidos da vítima (FBSP, 2023) e a maioria do gênero masculino (Cerqueira; Bueno, 2023).

O número de casos no ano de 2022 foi o maior da história do país e, embora esses números já sejam significativos, os crimes sexuais apresentam altos índices de subnotificação. Um estudo recente indicou que a estimativa de casos de estupro no Brasil é de aproximadamente 822 mil casos anuais (Cerqueira; Bueno, 2023).

Além da subnotificação, muitos casos não resultam em uma penalização legal, frequentemente, pela falta de vestígios que auxiliam na identificação desses agressores. De acordo com o Art. 158 do Código de Processo Penal Brasileiro,

“quando a infração deixar vestígios, será indispensável o exame de corpo de delito, direto ou indireto, não podendo supri-lo a confissão do acusado.”, ou seja, como os crimes sexuais deixam vestígios, a produção de prova pericial é necessária para a elucidação dos mesmos.

## 1. 2 ATUAÇÃO DA PERÍCIA CRIMINAL NOS CRIMES DE ESTUPRO

Nesse contexto, as mulheres vítimas de estupro são submetidas ao exame de corpo de delito, realizado em Departamento Médico-Legal (DML), onde são coletados materiais que possivelmente contenham vestígios deixados pelo agressor sexual, como suabes vaginais, anais e orais, roupas e/ou objetos como, por exemplo, preservativos que estejam relacionados à suposta agressão. Em seguida, esses materiais são encaminhados aos laboratórios forenses, onde comumente são realizados exames periciais complementares que visam a constatação de fluido seminal para a posterior obtenção de perfil genético do agressor.

A detecção de sêmen em amostras de casos de suposto estupro constitui uma prova pericial de extrema relevância, uma vez que pode fornecer evidências de contato ou penetração sexual (Davies; Wilson, 1974; Graves *et al.*, 1985; Teixeira, 1998). Na Polícia Civil do Espírito Santo, a pesquisa de sêmen humano inicia-se no Laboratório de Biologia Forense. Dentre os exames mais utilizados para triagem de fluido seminal, estão a pesquisa de espermatozoides por microscopia óptica (Allery *et al.*, 2001) e a pesquisa de antígeno prostático específico (PSA) por ensaio imunocromatográfico (Rao *et al.*, 2007; Hochmeister *et al.*, 1999; Laffan *et al.*, 2011). Geralmente, esses dois testes são realizados em associação para a pesquisa de sêmen.

A detecção de espermatozoides, células reprodutoras masculinas, em suabes de vítimas de suposto estupro é considerada uma prova técnica irrefutável de contato sexual (Indest 3rd, 1989). Porém, na maioria dos casos, não são detectados espermatozoides. Um levantamento feito no estado do Amapá, nos anos de 2007 a 2017, revela que somente 5% dos casos analisados positivaram para esse tipo de análise (Francez *et al.*, 2020). Outra avaliação realizada no Mato Grosso do Sul, nos anos de 2012 a 2015, demonstrou 22% de casos positivos para sêmen, considerando positivo a pesquisa de espermatozoides e/ou de PSA (Paulino *et al.*, 2017).

Vale enfatizar que a ausência de espermatozoides não exclui a agressão ou contato sexual. Essa falta pode ser explicada por diversos fatores, tais como o uso de preservativos, penetração sem ejaculação, intervalo prolongado entre o ato sexual e a coleta, higienização feita pela vítima após a agressão, acondicionamento inadequado das amostras, agressores vasectomizados, oligospermia (pessoas com quantidade reduzida de espermatozoides no sêmen) ou azoospermia (indivíduos com inexistência de espermatozoide no fluido seminal), entre outras razões (Paulino *et al.*, 2017; Woodling; Kossoris, 1981). Por esse motivo, aplicam-se outras técnicas, como os testes de PSA, quando o resultado for negativo para espermatozoides.

O PSA é uma glicoproteína produzida pela glândula prostática e secretada no plasma seminal. Inicialmente, achava-se que o PSA somente era encontrado no sêmen, entretanto estudos demonstram que tecidos extraprostáticos também produzem essa glicoproteína (Yu; Diamandis, 1995; Obiezu *et al.*, 2001). Nesse sentido, pesquisas apontam resultados falso-positivos de testes imunocromatográficos para detecção de PSA em amostras sem sêmen (Denison *et al.*, 2004; Unuma *et al.*, 2023). Apesar desses fatores, a análise de PSA é considerada confiável para fins forenses, visto que essa glicoproteína está presente em maiores concentrações no sêmen quando comparada com outros tecidos (Sawaya; Rolim, 2004), mas vale ressaltar a importância de se realizar outros testes para confirmar a detecção de fluido seminal (Denison *et al.*, 2004).

Nessa perspectiva, a triagem de sêmen tem grande importância não só na determinação de contato sexual, mas também nas análises de DNA, pois a morfologia distinta das paredes das células gaméticas possibilita a separação física de outros tipos celulares pelo método de extração diferencial de DNA por lise. Esse método é utilizado como técnica padrão para separar misturas em casos de crimes sexuais, dado que, frequentemente, essas amostras contêm quantidades consideráveis de material genético da vítima (Gill; Jeffreys; Werrett, 1985; Wiegand; Schürenkamp; Shütte, 1992; Laberke, 2012). Conseqüentemente, essa técnica de extração de DNA contribui para a obtenção do perfil genético masculino do suposto agressor (Gill; Jeffreys; Werrett, 1985).

### 1.3 GENÉTICA FORENSE

Apesar de ser uma área nova quando comparada a outras no âmbito forense, a análise de DNA é um dos métodos mais aplicados atualmente na rotina das Polícias Técnico-Científicas do Brasil e do mundo e sua relevância já alcançou um consenso geral na atividade da justiça (Walsh, 2005). O objetivo dos testes genéticos em casos de crimes sexuais é obter o perfil genético do agressor e compará-lo com um suspeito conhecido ou inseri-lo em um Banco de Perfis Genéticos (Francez *et al.*, 2020; Kobachuk *et al.*, 2023).

A criação dos Bancos de Perfis Genéticos proporcionou uma mudança de perspectiva na perícia criminal. Antes de sua implementação, era comum analisar apenas os vestígios em casos nos quais já havia suspeitos, uma vez que os testes genéticos forenses têm caráter comparativo. Os Bancos de Perfis Genéticos armazenam tanto perfis obtidos de vestígios coletados em locais de crime, quanto de pessoas (suspeitas, condenadas, desaparecidas etc.). Com a viabilidade de inserção de perfis em um banco de dados, atualmente tornou-se possível elucidar crimes sem suspeitos. Nesse contexto, é crucial que os laboratórios que abastecem esses bancos continuem inserindo o máximo de perfis possível.

Inicialmente, os exames de DNA forense eram mais laboriosos e menos sensíveis. A tipagem de DNA foi descrita pela primeira vez em 1985 pelo geneticista britânico Alec Jeffreys, utilizando-se a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) com enzimas de restrição. Ele identificou regiões de repetição no DNA e revelou que o número dessas repetições varia entre indivíduos, o que ficou conhecido como impressões digitais do DNA (do inglês *DNA fingerprint*). Essas regiões específicas foram denominadas Repetições em Tandem de Número Variável (VNTRs) ou minissatélites, consistindo em marcadores de polimorfismos com unidades de repetição entre 10 e 100 pares de bases (pb) (Jeffreys; Wilson; Thein, 1985; Butler, 2010; Rodrigues; Garrido, 2020).

A análise de uma ou poucas células se tornou possível com o advento de métodos de amplificação de DNA. Hoje, utilizam-se métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma técnica rápida e sensível que permite a amplificação de marcadores genéticos em quantidades analíticas. A PCR teve a sua primeira

demonstração prática realizada por Kary Mullis em 1983. A partir da PCR convencional, foram elaboradas novas modalidades de PCR como a PCR em Tempo Real (qPCR), na qual, além de amplificar as sequências de DNA, é possível acompanhar o aumento da concentração do produto na reação. Para isso, tecnologias de detecção de fluorescência, como, por exemplo, corantes fluorescentes intercalantes de DNA dupla fita ou sondas de hidrólise são incluídas na lista de reagentes que compõem a reação (Butler, 2010; Rodrigues; Garrido, 2020).

Os corantes fluorescentes na qPCR emitem fluorescência quando se ligam ao DNA de fita dupla e essa emissão é diretamente proporcional à quantidade de produto de PCR. Embora ofereçam a vantagem de serem de baixo custo, esses corantes são inespecíficos, uma vez que podem se ligar a qualquer molécula de DNA de fita dupla, incluindo produtos inespecíficos e dímeros de *primer* formados durante a reação. Para evitar essa questão técnica, a análise da curva de *melting*, ou curva de dissociação, após a PCR possibilita a detecção de amplificação inespecífica (Rodrigues; Garrido, 2020).

Já as sondas de hidrólise são moléculas que contêm uma sequência complementar ao alvo de interesse conjugada a uma molécula emissora de fluorescência na extremidade 5' (comumente denominada de *reporter*) e uma molécula supressora de fluorescência (comumente denominada de *quencher*) na extremidade 3'. Durante a amplificação, a sonda se liga ao alvo e a atividade da DNA polimerase faz com que a sonda seja hidrolisada, liberando a fluorescência, o que permite a detecção quantitativa do DNA amplificado em tempo real (Rodrigues; Garrido, 2020).

Os marcadores utilizados atualmente para testes de paternidade e identificação humana são as Repetições Curtas em Tandem (STRs), também denominadas como microssatélites, e consistem em regiões de sequências curtas de DNA altamente variáveis que também se repetem em tandem. Os STRs se distinguem dos VNTRs em relação ao tamanho das repetições, que variam entre 2 e 6 pb, e, por isso, apresentam maior eficiência no tratamento de amostras forenses, que geralmente apresentam baixa quantidade e qualidade de DNA. Esses marcadores encontram-se distribuídos ao longo do genoma humano, inclusive nos cromossomos sexuais (X e Y). Atualmente, utilizam-se *kits* comerciais que possibilitam a amplificação simultânea de mais de 20 loci STR, conferindo um elevado poder de discriminação, mesmo

quando se dispõe de uma reduzida quantidade de amostra (Butler, 2010; Butler, 2015; Rodrigues; Garrido, 2020).

Apesar das análises de STRs estarem bem estabelecidas e regulamentadas, em alguns casos, não há correspondências ou não há perfis conhecidos de uma pessoa de interesse para compará-lo. Para superar isso, um novo método de análise genética utilizando Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) surgiu no início dos anos 2000. Os SNPs são substituições de bases, inserções ou deleções, que normalmente são bi-alélicos com baixas taxas de mutação e alta herdabilidade. Além disso, o pequeno tamanho de seus *amplicons* de PCR os torna úteis para analisar amostras de DNA degradadas e em baixa quantidade. Esse tipo de marcador genético tem um grande potencial forense, uma vez que a previsão de características fenotípicas e a ancestralidade biogeográfica podem fornecer uma descrição física do doador da amostra. Embora já tenha sido aplicada em alguns casos forenses, essa técnica levanta várias questões éticas, legais e sociais sobre os limites de sua aplicação e, devido ao seu aparecimento relativamente novo, não há padronização de metodologias (Granja; Machado, 2020; Ortuño; May, 2023).

#### 1.4 MARCADORES GENÉTICOS DO CROMOSSOMO Y

A diferença genética entre homens (XY) e mulheres (XX) é determinada pela presença do cromossomo Y em homens. Os cromossomos X e Y divergem em tamanho e conteúdo genético, este contém 693 genes, sendo 107 genes codificadores de proteínas (Rhie *et al.*, 2023). Essa variação genética impacta o fenótipo masculino e é responsável pela determinação sexual, fertilidade e processo de espermatogênese (Gustafson; Donahoe, 1994; Graves; Foster, 1994; Rhie *et al.*, 2023). Assim sendo, a detecção de sequências específicas do cromossomo Y permite distinguir indivíduos XY e XX e, nos casos de crime sexual, essa diferença se faz muito útil.

A identificação do sexo genético pode ser realizada através de marcadores específicos de sexo, como, por exemplo, a região de determinação sexual do cromossomo Y (*SRY*), o gene da proteína testicular específica ligada ao cromossomo Y (*TSPY*), o gene da amelogenina (*AMELY*) e o pseudogene da esteroide sulfatase (*STSP1*).

O gene *SRY*, localizado no braço curto do cromossomo Y (Yp11.3), codifica um fator determinante de testículo que promove o desenvolvimento masculino ao desencadear o tecido gonadal indiferenciado de um embrião a formar os testículos (Graves, 2002; Rawal *et al.*, 2024). Esse gene é considerado um marcador alvo para detectar a presença de DNA masculino, apesar de só possuir uma única cópia no genoma (Kastelic; Budowle; Drobic, 2009).

O *TSPY* codifica a proteína testicular específica ligada ao cromossomo Y e acredita-se que esse gene esteja envolvido na espermatogênese. Recentemente, descobriu-se que as cópias do *TSPY* estão organizadas no terceiro maior conjunto genético do genoma humano e que o número de cópias é polimórfico em diferentes indivíduos, variando aproximadamente de 10 a 40 cópias (Rhie *et al.*, 2023). O gene está localizado no braço curto do cromossomo Y (Yp11.2), também podendo haver cópias no braço longo. Por ser um gene multicópias, o *TSPY* mostrou-se um marcador mais sensível para detecção de DNA masculino quando comparado ao *SRY*. Uma análise de sensibilidade do *TSPY* confirmou que este gene pode apresentar resultados a partir de 4 pg de DNA, enquanto o *SRY* só é detectável a partir de 80 pg (Jacot *et al.*, 2013).

O gene da amelogenina é responsável pela formação do esmalte do dente e está presente nos cromossomos X (*AMELX*) e Y (*AMELY*). O gene está localizado nas porções Xp22.1, Xp22.3 e Yp11.2 com uma deleção de 6 pb no cromossomo X, resultando em diferenças de tamanho entre os genes, o que possibilita a diferenciação sexual (Mannucci *et al.*, 1994; Faerman *et al.*, 1995; Dash; Rawat; Das, 2020; Elmrghni, 2023; Kurniawan *et al.*, 2023). A maioria dos *kits* comerciais de genotipagem forense inclui o marcador amelogenina para determinação do sexo. Porém, foram reportadas discrepâncias nos resultados das análises de sexagem com amelogenina, devido a deleções na região *AMELY* (Santos; Pandya; Tyler-Smith, 1998; Thangaraj; Reddy; Singh, 2002; Michael; Brauner, 2004; Laverde, 2013; Butler; Li, 2014). Para garantir a correta determinação sexual, os *kits* hoje disponíveis analisam, além da amelogenina, outros marcadores do Y.

Outro gene que também pode ser analisado é o *STS*, que codifica a esteróide sulfatase, uma enzima microssomal ligada à membrana que é expressa de forma ubíqua e hidrolisa sulfatos esteróides. Esses servem como precursores metabólicos de estrogênios, androgênios e colesterol. O *STS* encontra-se no braço curto do

cromossomo X, mas um pseudogene está presente no braço longo do Y (Yq11.211), portanto também pode ser utilizado para determinação sexual. A homologia da sequência entre *STS* e *STSP1* é de 84.5%, contudo, o *STSP1* não codifica nenhuma proteína funcional (Yen *et al.*, 1988; Morikawa; Yamamoto; Miyaishi, 2011).

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Como mencionado anteriormente, na maioria dos casos de crimes sexuais, o resultado da pesquisa de sêmen é negativo. Comumente, é realizada a análise de DNA apenas nos casos positivos para sêmen e, nos casos em que a triagem foi negativa, a análise pericial se encerra. Por esse motivo, a hipótese deste trabalho é que as análises atualmente utilizadas podem não estar detectando material biológico masculino em grande parte dos casos de crimes sexuais contra mulheres. Portanto, outras técnicas devem ser utilizadas como método de triagem para aumentar os números de detecção de material biológico dos agressores e, posteriormente, para que seja feita a análise de DNA.

Considerando que as análises citológicas (espermatozoides) e de imunocaptura (PSA) já são realizadas, outros tipos de técnicas poderiam ser implementadas. Nesse sentido, as análises moleculares se mostram uma opção promissora, uma vez que demonstram alta sensibilidade e especificidade. Mesmo quando os espermatozoides estão ausentes nas amostras de suabe de mulheres vítimas de estupro, células não espermiáticas também são deixadas pelo agressor como, por exemplo, células epiteliais, leucócitos e células germinativas imaturas (Chomont *et al.*, 2001). Essas células podem representar uma fonte viável de DNA masculino (Fedder, 1996). Outro aspecto que pode ser analisado é que os espermatozoides passam por mudanças após a ejaculação, devido à presença de fatores de degradação, e essas mudanças podem impedir a sua detecção nas pesquisas citológicas. No entanto, o DNA restante dessas células gaméticas ainda pode estar presente na amostra.

Estudos mostram que é possível detectar DNA masculino utilizando a técnica de qPCR em casos em que as amostras se encontrem degradadas e/ou contenham pouco material genético como, por exemplo, em casos de identificação do sexo de ossadas (Poma *et al.*, 2022) e de sexagem fetal (Larsen *et al.*, 1996; Boon *et al.*, 2007). Ademais, em reações de qPCR-duplex, é possível analisar a amplificação de dois

genes simultaneamente. Nesse sentido, a escolha dos marcadores no presente trabalho se deu com objetivo de detectar DNA masculino em amostras de suabe vaginal e anal de mulheres vítimas de suposto estupro e ter um controle positivo interno. Para a detecção de cromossomo Y, o gene *TSPY* foi considerado a melhor opção por apresentar várias cópias no genoma. Essa característica permite uma detecção mais sensível, especialmente em amostras com quantidades limitadas de DNA masculino e/ou material degradado. Em relação ao controle positivo da reação, para garantir a presença de DNA em quantidades detectáveis e o adequado funcionamento da mesma, o gene *STS* foi considerado uma escolha adequada por estar presente no cromossomo X e também ter se mostrado um marcador sensível.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a viabilidade técnica da PCR em tempo real como método de triagem de material biológico masculino em amostras de suabe de mulheres vítimas de suposto estupro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar e quantificar o DNA masculino em amostras de suabe vaginal e anal por meio do *kit* comercial *Quantifiler Trio DNA Quantification kit* (Applied Biosystems) com tecnologia TaqMan;
- Testar e comparar ensaios *in house* de PCR duplex em tempo real com o reagente *SYBR Green* e três combinações distintas de primers para os genes-alvo *TSPY* e *STS* para detecção de DNA masculino;
- Comparar as reações de PCR em tempo real (tecnologias TaqMan e *SYBR Green*) com os métodos convencionais de pesquisa de sêmen (contagem de espermatozoides e PSA) quanto a sua eficácia na triagem de amostras de mulheres vítimas de suposto estupro;
- Verificar o desempenho das reações de PCR em tempo real (tecnologias TaqMan e *SYBR Green*) nas amostras negativas para pesquisa de sêmen;
- Estudar a existência de associação entre a contagem de espermatozoides e a concentração de DNA masculino em um subconjunto amostral.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO (FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO)

Manuscrito a ser submetido à revista Forensic Science International: Genetics

Qualis CAPES área Biotecnologia: A1

#### 1. Introduction

Sexual violence represents an alarming issue in the context of security and public health, according to the World Health Organization (WHO). In Brazil, the number of rape cases in 2022 was the highest in the country's history with 74.930 reported cases. Although these figures are already substantial, sexual assault has high rates of underreporting and the actual estimated number of rape cases is approximately 822.000 cases per year (FBSP, 2023; Cerqueira; Bueno, 2023).

The insertion of genetic profiles in DNA databases can assist the investigation of sexual assault and offers the opportunity to review potential wrongful convictions. Before DNA databases, it was only possible to investigate cases with known sexual offenders, now it is possible to elucidate crimes without suspects (Amaral *et al.*, 2023; Bastos; Bissoli; Morais, 2023). An assessment made by the Brazilian Integrated Network of DNA Database (RIBPG) revealed the existence of a backlog of more than 150.000 biological samples from sexual assault to be processed in Brazilian forensic laboratories (RIBPG, 2023). In this context, increasing the number of genetic profiles inserted into databases can contribute to reducing these backlogs and solving cold cases.

However, current DNA analysis practices typically focus on cases where semen is detected. In instances where screening yields negative results, the forensic analysis often concludes. Among the most widely employed tests for seminal fluid screening are spermatozoa analysis using optical microscopy (Allery *et al.*, 2001) and prostate specific antigen (PSA) tests using an immunochromatographic assay (Rao *et al.*, 2007; Hochmeister *et al.*, 1999; Laffan *et al.*, 2011). Nevertheless, in most cases, seminal fluid is not detected. During the years of 2022 and 2023, in the state of Espírito Santo, Brazil, only 11% of the cases analyzed were positive for spermatozoa. Regarding the

state of Amapá, from 2007 to 2017, only 5% were positive for spermatozoa (Francez *et al.*, 2020). Another evaluation carried out in the state of Mato Grosso do Sul, from 2012 to 2015, demonstrated 22% of positive cases for semen, considering both exams (sperm cells and/or PSA test) (Paulino *et al.*, 2017).

For this reason, the present study hypothesizes that the current methods may not be detecting male biological material in many cases of sexual assault against women. Therefore, other techniques should be used as a screening method to increase the detection numbers of biological evidence from sexual offenders and, subsequently, for DNA analysis to be carried out.

Considering that cytological (spermatozoa) and immunocapture (PSA) tests are already being executed, other types of methods could be implemented. In this sense, molecular analysis is a promising option, as they demonstrate high sensitivity and specificity. Even when sperm are absent from swab samples of female rape victims, non-sperm cells are also left behind by the perpetrator, such as epithelial cells, leukocytes, and immature germ cells (Chomont *et al.*, 2001).

Researches have shown that it is possible to detect male DNA using real-time PCR (qPCR) in cases where semen samples are degraded and/or contain little genetic material (Martínez *et al.*, 2015; Ginart *et al.*, 2019), as well as in cases of sex identification of skeletons (Poma *et al.*, 2022) and in fetal sexing (Larsen *et al.*, 1996; Boon *et al.*, 2007). In this sense, we deemed qPCR to be a suitable technique for the present study, as it is specific, sensitive, rapid and already familiar to forensic experts.

Thus, we compared four different assays of qPCR. We utilized a commercial DNA quantification *kit* with TaqMan probes and conducted three different *in house* qPCR-duplex reactions with SYBR Green dye for detection purposes. For the SYBR Green assays we selected two different genes as Y chromosome markers: testis specific protein Y-linked gene (*TSPY*) and steroid sulfatase pseudogene (*STSP1*).

The *TSPY* gene encodes the specific testicular protein linked to the Y chromosome and is believed to be involved in spermatogenesis. This gene has different copy numbers among individuals, ranging approximately from 10 to 40 copies (Rhie *et al.*, 2023). As a multicopy gene, *TSPY* proved to be a more sensitive marker for detecting male DNA when compared to others (Jacot *et al.*, 2013).

The *STS* gene encodes steroid sulfatase, a membrane-bound microsomal enzyme that is ubiquitously expressed and hydrolyzes steroid sulfates. These serve as metabolic precursors of estrogens, androgens, and cholesterol. The *STS* is found on the X chromosome, but a pseudogene is present on the long arm of the Y, hence it can also be used for sex determination. The sequence homology between *STS* and *STSP1* is 84.5%; however, *STSP1* does not encode any functional proteins (Yen *et al.*, 1988; Morikawa; Yamamoto; Miyaishi, 2011).

The aim of this project was to evaluate the technical feasibility of real-time PCR as a screening method for swab samples from women who are victims of sexual assault. Our main interest was on samples for which a negative result was obtained in the semen screening. Also, we studied the existence of an association between sperm count and male DNA concentration in a subset of samples.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Samples*

Vaginal and anal swabs were collected by coroners at the Legal Medicine Department of the Civil Police of Espírito Santo State (PCES), Brazil, spanning from January 2022 to October 2023. As standard protocol for forensic examination of rape victims, two swabs were collected for each region—vaginal and anal. One swab from each region was sent to the Forensic Biology Laboratory and the other to the Forensic DNA Laboratory. The only inclusion criterion for the selected samples was that the victims had to be female. Following routine testing with PSA and sperm cytology (SC), the Forensic Biology Laboratory provided 176 swab samples, each comprising 100µL of the first swab wash with TBS (Tris Buffered Saline). These samples were stored at -20°C until analyzed.

Regarding ethical aspects, this study was submitted to the Research Ethics Committee of the Center for Health Sciences linked to the Federal University of Espírito Santo and approved under protocol number 5.622.741 and the resolution of National Health Council N°. 466 (from December 12, 2012) was followed.

### *2.2. Semen screening: PSA test and sperm cytology (SC)*

PSA and SC tests were performed by forensic experts in the Forensic Biology Laboratory of PCES. SC test was performed using the smear slide method and Corin & Stockis coloration technique (Corin; Stockis, 1908). Preparations were microscopically screened for spermatozoa under 400x magnification and the presence or absence was recorded (qualitative analysis). The sample was considered positive when at least one sperm cell was unequivocally detected.

PSA test was performed only if the result for SC was negative. PSA results were determined by immunochromatographic assay performed by PSA Semi-Quantitativo ECO Teste commercial *kit* (ECO Diagnóstica Ltda., Minas Gerais, Brazil) according to manufacturer's recommendations.

The results of both tests are compiled in Table 3.

### *2.3. Semiquantitative sperm classification*

Based on a previously published method (Cândido *et al.*, 2021), 22 out of 176 samples had their sperm cells counted as an additional step in semen screening in the Forensic Biology Laboratory of PCES. According to the quantity of sperm per slide (sperm/slide), the following classification was adopted: i) rare (from 1 to 5 sperm/slide); ii) moderate (from 6 to 10 sperm/slide); iii) numerous (11 or more sperm/slide).

### *2.4. DNA extraction and TSPY/STS amplification with SYBR Green*

Samples from 176 swabs were exposed to Proteinase K and extraction buffer treatment followed by organic phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). DNA from each sample was extracted and eluted in 50 µl of ultrapure water, 3 µl was used per reaction. The regions analyzed in this research were amplified by qPCR in three different duplex reactions shown in Table 1. The primers sequences and reagents were used as described by Poma *et al.*, 2022. Except for the primer concentration, which, in our study, demonstrated the most favorable results at 0,5 µM. The primer sequences are shown in Table 2.

For the **TSPY67/STS95** (duplex 1) assay, the thermal cycler program consisted of a UDG activation at 50 °C for 2 minutes, an initial heat activation step at 95 °C for 2 minutes, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 seconds, 58 °C for 15 seconds and 60 °C

for 1 minute and an analysis of the melting curve with temperature ramp from 60 °C to 95 °C, rising by 1°C every 5 seconds.

For **TSPY119/STS89** (duplex 2) and **STS158/STS89** (duplex 3) reactions, the thermal cycler program consisted of a UDG activation at 50 °C for 2 minutes, an initial heat activation step at 95 °C for 2 minutes, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 1 minute and an analysis of the melting curve with temperature ramp from 60 °C to 95 °C.

The qPCRs were performed with a Rotor Gene Q 5Plex HRM (QIAGEN, Germany) using SYBR Green dye (PowerUp SYBR Green Master Mix - Applied Biosystems) to detect DNA synthesis.

Reactions were performed using a male DNA positive control (two peaks), a female DNA positive control (single peak) and a DNA negative control with ultrapure water (no amplification).

DNA extractions and real-time PCR reactions were performed in the Federal University of Espírito Santo (UFES).

**Table 1. Pair of primers used in qPCR-duplex assays.** Optimal concentrations and expected amplicons according to sex for each pair of primers. Source: POMA *et al.*, 2022 (adapted).

Duplex	Pairs of Primers	Concentrations of Primers	Sex	Amplicons
1	<b>STS95</b>	0,5 µM	Female	95 bp
	<b>TSPY67</b>	0,5 µM	Male	95 bp/67 bp
2	<b>STS89</b>	0,5 µM	Female	89 bp
	<b>TSPY119</b>	0,5 µM	Male	89 bp/119 bp
3	<b>STS89</b>	0,5 µM	Female	89 bp
	<b>STS158</b>	0,5 µM	Male	89 bp/158 bp

**Table 2. List of primers used.** Source: POMA *et al.*, 2022 (adapted).

Primers	Primer	Primer sequence 5'-3'	Annealing temperature
<b>TSPY67</b>	Forward	GCTTCTCATTCCACTCCAATTGA	58 °C
	Reverse	GGTGTCTGCGGCGATAGG	
<b>TSPY119</b>	Forward	GCTTCTCATTCCACTCCAATTGA	60 °C
	Reverse	CCTGCGAAGTTGTGGTCAGA	
<b>STS89</b>	Forward	CATTCATAGAGAAAGGCTAAAGGTATCA	60 °C
	Reverse	CCTTTGCTGGCTTATATTTTTTATGC	
<b>STS95</b>	Forward	CATTCATAGAGAAAGGCTAAAGGTATCA	58 °C
	Reverse	ACATACCCTTTGCTGGCTTATATTTT	
<b>STS158Y</b>	Forward	GCACCAGGGTGGCTTATCTT	60 °C
	Reverse	TATGCTCCAGGGAAAACGCA	

### 2.5. Male DNA quantification with TaqMan technology

DNA quantification was carried out in 176 samples and was performed by real-time PCR with TaqMan probes technology, using the Quantifiler Trio DNA Quantification *kit* (Applied Biosystems, California, USA) and the QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA), according to manufacturer's instructions. Data were analyzed in the HID Real-Time PCR Analysis Software Version 1.3.

### 2.6. Results interpretation, sensitivity and specificity

Amplification of specific regions of the Y chromosome detects the presence of male DNA in the swab samples. The presence of Y DNA in qPCR-duplex assays was compared with results from DNA quantification in order to analyze sensitivity and specificity to validate the methodology. In DNA quantification, any value above zero was considered positive for male DNA.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using Jupyter Notebook, a web-based interactive computing platform, with Python programming language version 3.9.0. In the cases in which the number of spermatozoa per slide was counted, to evaluate the difference between the groups (rare, moderate and numerous) and the amount of male DNA (in nanogram) quantified, the one-way ANOVA test with a *posteriori* Tukey test was used. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Male DNA quantification with TaqMan commercial assay

Table 3 displays the compiled results of DNA quantification. Out of the 176 samples, male DNA was detected in 125 (71%). The lowest detected concentration was 0.000117 ng/ $\mu$ l. Among the 67 samples positive for sperm cells, only one did not show quantifiable male DNA. Regarding the 25 PSA-positive cases, 5 did not show Y DNA. Notably, among the 84 samples with negative results for sperm and PSA, 39 (46.4%) presented male DNA.

**Table 3. Results of real-time PCR male DNA quantification and detection regarding semen screening.**

	(+) SPTZ: 67*	(-) SPTZ: 109		Total: 176
		(+) PSA: 25**	(-) SEMEN: 84***	
<b>DNA quantification</b>	66 (98.5%)	20 (80%)	39 (46.4%)	125 (71%)
<b>Duplex 1</b>	57 (85%)	10 (40%)	10 (11.9%)	77 (43.75%)
<b>Duplex 2</b>	59 (88%)	9 (36%)	11 (13.1%)	79 (45%)
<b>Duplex 3</b>	17 (25.4%)	2 (8%)	1 (1.2%)	20 (11.4%)

\* 67 samples tested positive for spermatozoa (PSA tests were not performed);

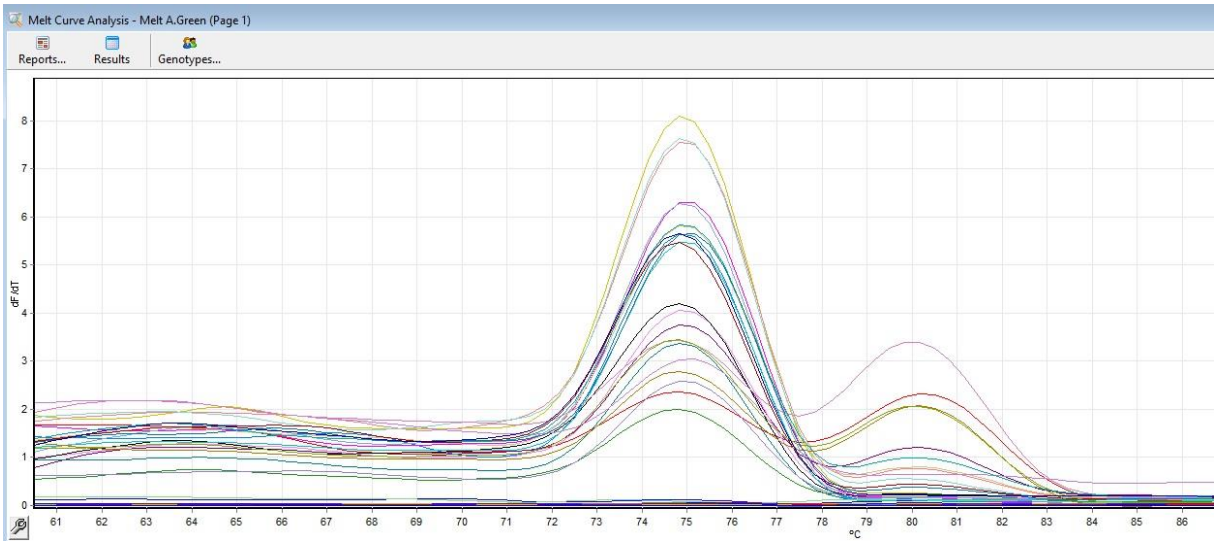
\*\* 25 samples tested negative for SPTZ and positive for PSA;

\*\*\* 84 samples tested negative for both analyses, so they were classified as negative for the presence of semen.

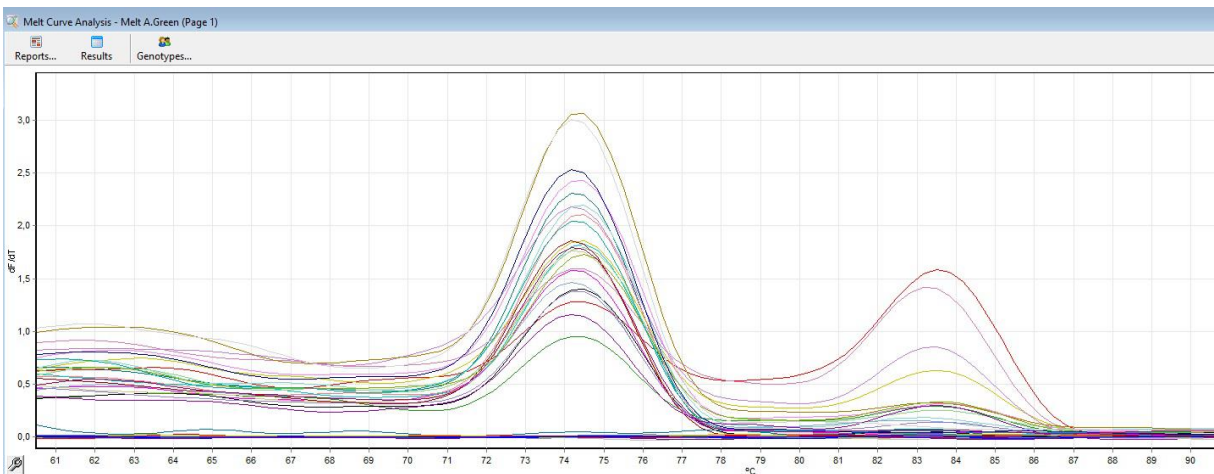
### 3.2. qPCR-duplex

When compared to DNA quantification, none of the qPCR-duplex reactions demonstrated false positive results; however, they showed false negatives. The duplex 2 assay yielded 79 (45%) positive outcomes for male DNA, with the lowest detected amount being 0.000405 ng/ $\mu$ l. The duplex 1 presented 77 (43.75%) positive results, registering a minimum concentration of 0.000506 ng/ $\mu$ l. Simultaneously, both reactions yielded the same positive count in 74 (42%) samples. The duplex 3 reaction identified only 20 (11.4%) positive samples. Regarding the 84 samples with negative results for sperm and PSA, the duplex 2 assay detected Y DNA in 11 (13.1%) cases, while the duplex 1 identified 10 (11.9%). In the 67 positive cases for sperm and male DNA, the duplex 2 and duplex 1 reactions identified as positive 59 (88%) and 57 (85%) samples, respectively.

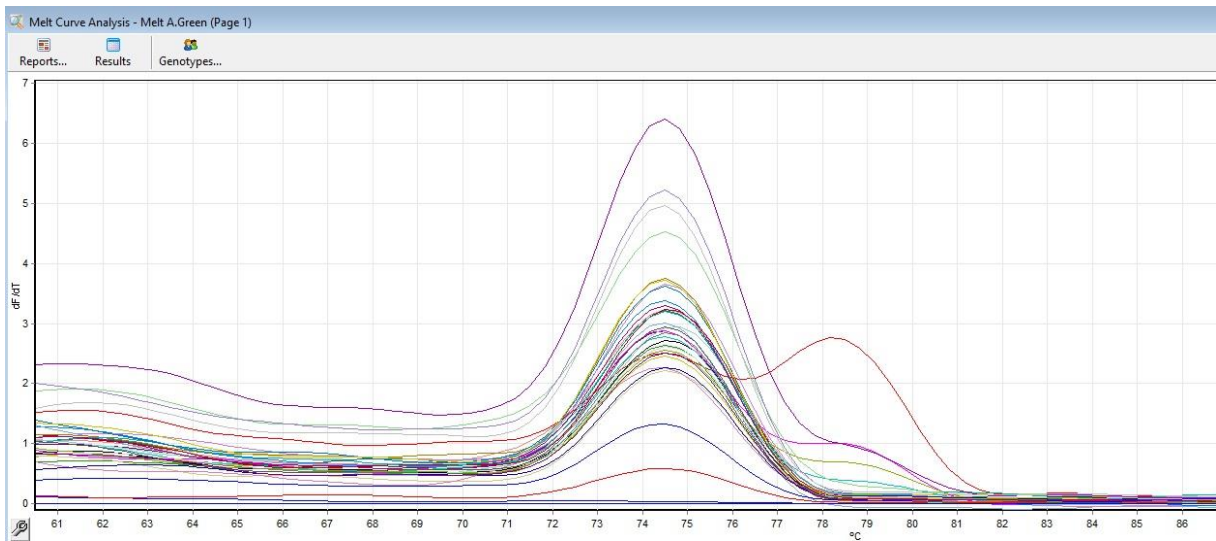
All the compiled results are also shown in Table 3, and Figures 1, 2 and 3 show the results of the melting curves of duplex 1, 2 and 3, respectively.



**Figure 1.** Melting curve of the amplified products in the TSPY67/STS95 reaction (Duplex 1). The two peaks indicate the detection of male DNA in the samples. The melting temperatures corresponding to the STS95 and TSPY67 markers were approximately 75°C and 80.5°C, respectively.



**Figure 2.** Melting curve of the amplified products in the TSPY119/STS89 reaction (Duplex 2). The two peaks indicate the detection of male DNA in the samples. The melting temperatures corresponding to the STS89 and TSPY119 markers were approximately 74.5°C and 83.5°C, respectively.

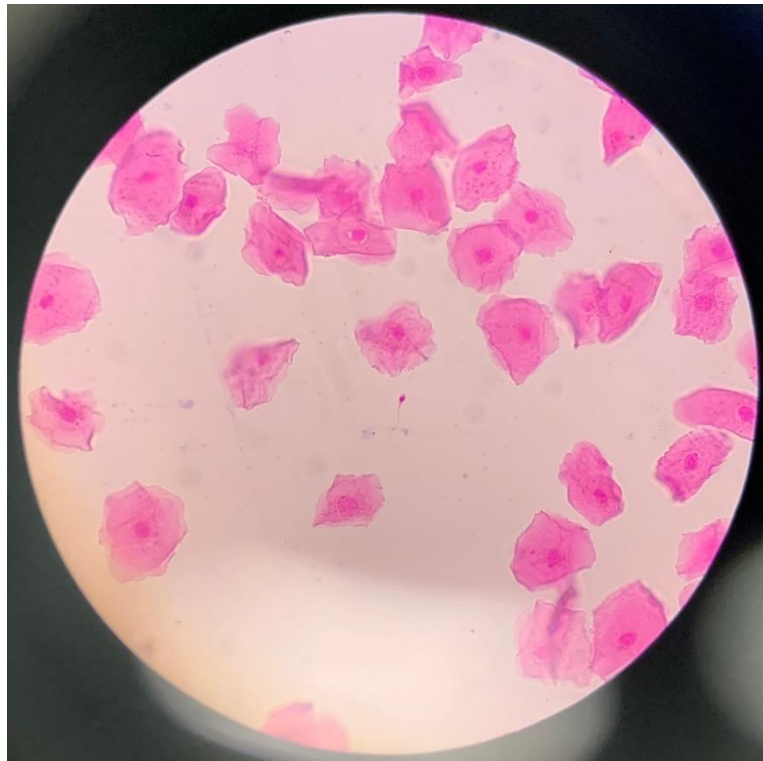


**Figure 3.** Melting curve of the amplified products in the STS158/STS89 reaction (Duplex 3). The two peaks indicate the detection of male genetic material in the samples. The melting temperatures corresponding to the STS89 and STS158 markers were approximately 74.5°C and 78.3°C, respectively.

### 3.3. Semiquantitative sperm classification and statistical analysis

In cases with “rare” counting, shown in Figure 4, the concentration of male DNA ranged from 0.00024 to 0.004137 ng/μl. “Moderate” scored samples exhibited concentrations from 0.008572 to 0.046148 ng/μl. For “numerous” counting, the variation varied from 0.0037 to 2.014549 ng/μl.

Regarding the qPCR-duplex reactions, both *TSPY* assays yielded identical outcomes, with positive results for male DNA obtained in 18 (82%) out of 22 samples. The 4 negative cases fell within the “rare” classification group. Despite this occurrence, the statistical analysis showed non-significant differences between the amounts of male DNA in the “rare” ( $0.01009 \pm 0.02111$  ng), “moderate” ( $0.03265 \pm 0.01454$  ng), and “numerous” ( $0.3179 \pm 0.59259$  ng) groups. In terms of the *STS158/STS89* reaction, only 6 samples tested positive for Y DNA. The one-way ANOVA p-value was approximately 0.287. Regarding the Tukey test, the comparison of “rare” and “moderate”, “rare” and “numerous”, “moderate” and “numerous” groups resulted in a p-value of 0.996, 0.3093 and 0.5134, respectively.



**Figure 4.** Sperm cell and epithelial cells under optical microscopy in 400x magnification.

#### **4. Discussion**

The use of DNA databases has revolutionized forensic genetics and police investigation by enabling the processing of samples from cases without a suspect. Currently, only a few sexual crime cases are solved in Brazil, and one contributing factor may be the limited number of cases that have their samples processed for DNA testing (Carvalho *et al.*, 2020). Therefore, semen screening is essential not only because it is a significant evidence itself (Butler, 2023), but also to optimize DNA exams by selecting promising samples.

Many studies corroborate the argument that increasing the number of tests conducted in semen screening would be beneficial for elucidating sexual crimes (Denison *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2015; Rathod, 2021). Incorporating a molecular analysis step in semen screening appears to be appropriate, as demonstrated its sensitivity and precision (Suttipasit, 2019). This study not only supports these findings but also explores how the implementation of a molecular test could increase the number of cases examined by forensic DNA laboratories. It is worth highlighting that, using

genotyping methods, the detection of male DNA would not indicate the presence of semen itself, but rather male contact, without defining the type of cell or biological fluid present in a sample.

Our study revealed the presence of male DNA in 46.4% of cases negative for sperm cells and PSA, a significant proportion often overlooked by most Brazilian forensic laboratories. While it is relevant to question the outcome of these results in Forensic DNA Laboratories, further studies with larger sample size and feasibility analysis for obtaining autosomal genetic profiles from these samples would be required. According to Henry and Scandrett (2019) it was possible to obtain in 50% of the analyzed samples full or partial Y-STR profiles. Also, Toselli, Pacheco and Dias Filho (2020), isolated male genetic profile in 46.4% in cases that tested negative for spermatozoa and positive for PSA, through sperm and/or epithelial cells of the perpetrator.

The two (duplex 1 and 2) out of three qPCR-duplex assays tested in the present study demonstrated that in a little more than 10% of cases negative for spermatozoa and PSA, it was possible to detect the presence of male DNA. Although these techniques did not prove to be as sensitive as DNA quantification with TaqMan probes, the SYBR Green-based assays could be used for screening in cases where quantification is not economically feasible, as it is a more affordable method (Tao *et al.*, 2022).

The disparity in results between DNA quantification and the qPCR-duplex assays may be attributed to the distinct methodologies employed by TaqMan probes and SYBR Green dye (Nielsen *et al.*, 2006). The former relies on intermolecular interactions, where the probe is designed to bind within the amplified PCR fragment, and a fluorescent signal is generated only upon successful hybridization with its complementary target. In contrast, the latter employs an intercalating dye that binds to double-stranded DNA without exhibiting specificity (Tajadini; Panjehpour; Javanmard, 2014). For this reason, in the present study, we conducted a melting curve analysis to ensure that the fluorescence signal originated from the desired DNA sequence and not from non-specific products or primer dimers (Arya *et al.*, 2005).

In order to investigate the negative results for male DNA in qPCR-duplex that were positive for spermatozoa, we studied the existence of an association between sperm count and male DNA concentration in a subset of samples. An additional step was

introduced in sperm cytology, involving the counting of spermatozoa per slide. As expected, samples that failed to amplify male DNA in the *in house* reactions exhibited a low sperm cell count. However, statistical analysis did not yield significant results for differences in male DNA quantity among groups with varying classifications of spermatozoa quantities. In contrast to Cândido *et al.* (2021), the DNA quantification revealed that samples classified as the “numerous” group had a higher concentration of male DNA when compared to “moderate” and “rare” groups. However, they did not observe a significant difference between the classifications of “rare” and “moderate”, although a linear relationship was expected between the number of sperm cells and male DNA quantification.

Thus, among the molecular analysis methodologies, real-time PCR presents itself as a powerful tool for male DNA detection in forensic analysis, offering several compelling advantages (Roccazzello *et al.*, 2004; Ginart *et al.*, 2019; Henry; Scandrett, 2019). Its high sensitivity enables the detection of trace amounts of DNA and provides rapid results in situations that require fast diagnosis or screening. The technique's quantitative capabilities further enhance its utility, providing valuable insights into DNA concentration levels and it can easily be automated, simplifying workflows and reducing the potential for human error. Also, real-time PCR is already in use in forensic laboratories, so it is already a familiar technique for forensic experts.

## **5. Conclusion**

The present study demonstrated that the use of real-time PCR can be a robust tool for detecting Y DNA as a screening method to identify male contact in cases involving sexual assault. In this regard, DNA quantification could potentially yield promising results for police investigations.

This research also revealed that nearly half of the anal and vaginal swabs from rape victims, which tested negative in the semen screening, contained male DNA. It is important to highlight that the absence of detected semen would typically conclude the forensic analysis. Even in cases where obtaining the genetic profile of the perpetrator proves impossible due to very low concentrations of male DNA, this data could still be utilized as evidence of male contact in cases of sexual assault.

Ultimately, given the numerous untested forensic traces in this category of crime, the forensic DNA laboratories should consider increasing the number of samples analyzed, either by creating new screening methods or by considering the analysis of all samples, to enhance resolution rates in cases of sexual assault.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o uso de PCR em Tempo Real pode ser uma ferramenta robusta para detectar o DNA do cromossomo Y como um método de triagem para identificar o contato masculino em casos envolvendo crimes sexuais. Nesse sentido, a quantificação de DNA poderia proporcionar resultados promissores para a investigação policial.

Além disso, este estudo revelou que quase metade dos suabes anais e vaginais de vítimas de estupro que testaram negativo na triagem de sêmen continham DNA masculino. É importante destacar que a ausência de sêmen na triagem, comumente, encerra a análise forense. Mesmo nos casos em que a obtenção do perfil genético do agressor se mostra impossível devido a concentrações muito baixas de DNA masculino, esses dados ainda poderiam ser utilizados como evidência de contato masculino em casos de crimes sexuais.

Em relação às técnicas de PCR em Tempo Real utilizadas, o ensaio de quantificação de DNA com TaqMan se mostrou mais sensível para detectar DNA masculino quando comparado às técnicas *in house* de qPCR-duplex com SYBR Green. Porém, esses ensaios poderiam ser realizados para triagem quando a quantificação de DNA com *kits* comerciais não é economicamente viável, uma vez que são métodos mais acessíveis.

Ademais, a avaliação realizada para verificar a existência de associação entre a contagem de espermatozoides e a concentração de DNA masculino em um subconjunto amostral não apresentou resultados significativos. Dado que apenas um número limitado de amostras passou por esta etapa, aumentar o tamanho amostral seria necessário para se obter resultados mais confiáveis.

Em última análise, diante da grande quantidade de vestígios forenses não testadas nessa categoria de crime, os laboratórios de DNA forenses devem considerar aumentar o número de amostras analisadas, seja criando novos métodos de triagem ou considerando a análise de todas as amostras, para melhorar os índices de resolução nos casos de crimes sexuais.

## REFERÊNCIAS

ALLERY, J. P. *et al.* Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. **J Forensic Sci**, v. 46, n. 2, p. 349–351, 2001.

AMARAL, T. M. *et al.* Importância do Banco Nacional de Perfis Genéticos para a resolução de crimes sem suspeitos. **Rev Bras Crimin**, v. 12, n. 5, p. 123–128, 2023.

ARYA, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.

BASTOS, V. V.; BISSOLI, C. F.; MORAIS, F. V. Importância da adição de DNA no banco de dados para identificação de criminosos sexuais. **Res Soc Dev**, v. 12, n. 11, p. e61121143648, 2023.

BOON, E. M. J. *et al.* Y chromosome detection by Real Time PCR and pyrophosphorolysis-activated polymerisation using free fetal DNA isolated from maternal plasma. **Prenat Diagn**, v. 27, n. 10, p. 932–937, 2007.

BUTLER, J. M. **Fundamentals of Forensic DNA Typing**. 1. ed. USA: Academic Press, 2010. 520 p.

BUTLER, E.; LI, R. Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis. **J Forens Invest**, 2014.

BUTLER, J. M. The future of forensic DNA analysis. **Phil Trans R Soc B**, v. 370, n. 1674, p. 20140252, 2015.

BUTLER, J. M. Recent advances in forensic biology and forensic DNA typing: INTERPOL review 2019–2022. **Forensic Sci Int**, v. 6, n. 100311, p. 100311, 2023.

CÂNDIDO, A. L. *et al.* Classificação semiquantitativa de espermatozoides otimiza a genotipagem de *backlog* de amostras de crimes sexuais. **Rev Bras Crimin**, v. 10, n. 1, p. 36–43, 2021.

CARVALHO, N. R. *et al.* The contribution of DNA databases for stored sexual crimes evidences in the central of Brazil. **Forensic Sci Int Genet**, v. 46, n. 102235, p. 102235, 2020

CERQUEIRA, Daniel; BUENO, Samira (coord.). **Atlas da violência 2023**. Brasília: Ipea; FBSP, 2023. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.38116/riatlasdaviolencia2023>. Acesso em: 26 dez. 2023.

CHOMONT, N. *et al.* Detection of Y chromosome DNA as evidence of semen in cervicovaginal secretions of sexually active women. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 5, p. 955–958, 2001.

CORIN, G.; STOCKIS, E. Recherche des taches spennatique sur le linge. Arch. Anthropol. **Crim Med Leg**, p. 852-864, 1908.

DASH, H. R.; RAWAT, N.; DAS, S. Alternatives to amelogenin markers for sex determination in humans and their forensic relevance. **Mol Biol Rep**, v. 47, n. 3, p. 2347–2360, 2020.

DAVIES, A.; WILSON, E. The persistence of seminal constituents in the human vagina. **Forensic Sci**, v. 3, n. 1, p. 45–55, 1974.

DENISON, S. J. *et al.* Positive prostate-specific antigen (PSA) results in semen-free samples. **Can Soc Forens Sci J**, v. 37, n. 4, p. 197–206, 2004.

ELMRGHNI, S. Role of Amelogenin in Human Identification. **Ann Clin Med Case Rep**, v. 11, n. 14, p. 1–7, 2023.

FAERMAN, M. *et al.* Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. **Gene**, v. 167, n. 1–2, p. 327–332, 1995.

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

FÓRUM BRASILEIRO DE SEGURANÇA PÚBLICA. **17º Anuário Brasileiro de Segurança Pública**. São Paulo: Fórum Brasileiro de Segurança Pública, 2023. Disponível em: <https://forumseguranca.org.br/wp-content/uploads/2023/07/anuario-2023.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2023.

FRANCEZ, P. *et al.* Avaliação dos casos de crimes sexuais atendidos em um laboratório forense do extremo norte da região amazônica brasileira entre os anos de 2007 a 2017. **R Crim Med Leg**, v. 05, n. 01, 2020.

GILL, P.; JEFFREYS, A. J.; WERRETT, D. J. Forensic application of DNA “fingerprints”. **Nature**, v. 318, n. 6046, p. 577–579, 1985.

GINART, S. *et al.* Human DNA degradation assessment and male DNA detection by quantitative-PCR followed by high-resolution melting analysis. **Forensic Sci Int**, v. 295, p. 1–7, 2019.

GRANJA, R.; MACHADO, H. Forensic DNA phenotyping and its politics of legitimation and contestation: Views of forensic geneticists in Europe. **Soc Stud Sci**, v. 53, n. 6, p. 850–868, 2020.

GRAVES, H. C. B.; SENSABAUGH, G. F.; BLAKE, E. T. Postcoital detection of a male-specific semen protein: Application to the investigation of rape. **N Engl J Med**, v. 312, n. 6, p. 338–343, 1985.

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

GRAVES, J. A. M. Evolution of the testis-determining gene—the rise and fall of SRY. *In*: **The Genetics and Biology of Sex Determination**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. p. 86–101.

GUSTAFSON, M. L.; DONAHOE, P. K. Male sex determination: current concepts of male sexual differentiation. **Annu Rev Med**, v. 45, n. 1, p. 505–524, 1994.

HENRY, J.; SCANDRETT, L. Assessment of the Yfiler® Plus PCR amplification kit for the detection of male DNA in semen-negative sexual assault cases. **Sci Justice**, v. 59, n. 5, p. 480–485, 2019.

HOCHMEISTER, M. N. *et al.* Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. **J Forensic Sci**, v. 44, n. 5, p. 1057–1060, 1999.

INDEST, G. F., 3rd. Medico-legal issues in detecting and proving the sexual abuse of children. **Med Sci Law**, v. 29, n. 1, p. 33–46, 1989.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Estupro no Brasil: uma radiografia segundo os dados da Saúde**. Brasília: Ipea, 2014.

JACOT, T. A. *et al.* TSPY4 is a novel sperm-specific biomarker of semen exposure in human cervicovaginal fluids; potential use in HIV prevention and contraception studies. **Contraception**, v. 88, n. 3, p. 387–395, 2013.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, v. 314, 1985.

KASTELIC, V.; BUDOWLE, B.; DROBNIČ, K. Validation of *SRY* marker for forensic casework analysis. **J Forensic Sci**, v. 54, n. 3, p. 551–555, 2009.

KOBACHUK, L. D. G. *et al.* Processamento de *backlog* de vestígios de crimes sexuais no Estado do Paraná. **Rev Bras Crimin**, v. 12, n. 2, p. 55–60, 2023.

KURNIAWAN, A. *et al.* The significance of amelogenin loci from toothpicks as forensic evidence for sex determination. **J Taibah Univ Med Sci**, v. 18, n. 1, p. 148–153, 2023.

LABERKE, P. J. *et al.* Method to predict the chance of developing a male profile out of mixtures of male and female DNA. **Int J Legal Med**, v. 126, n. 1, p. 157–160, 2012.

LAFFAN, A. *et al.* Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. **Med Sci Law**, v. 51, n. 1, p. 11–17, 2011.

LARSEN, L. A. *et al.* Quantitative detection of male DNA by polymerase chain reaction using a single primer set: application to sex determination and counting of rare fetal cells. **Anal biochem**, v. 240, n. 1, p. 148–150, 1996.

LAVERDE, L. Sex determination problems in forensic genetic analysis. **Forensic Sci Int Genet Suppl Ser**, v. 4, n. 1, p. e350–e351, 2013.

MANNUCCI, A. *et al.* Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. **Int J Legal Med**, v. 106, n. 4, p. 190–193, 1994.

MARTÍNEZ, P. *et al.* Semen searching when sperm is absent. **Sci Justice**, v. 55, n. 2, p. 118–123, 2015.

MICHAEL, A.; BRAUNER, P. Erroneous gender identification by the amelogenin sex test. **J Forensic Sci**, v. 49, n. 2, p. 258–259, 2004.

MORIKAWA, T.; YAMAMOTO, Y.; MIYAISHI, S. A new method for sex determination based on detection of *SRY*, *STS* and amelogenin gene regions with simultaneous amplification of their homologous sequences by a multiplex PCR. **Acta Med Okayama**, v. 65, n. 2, p. 113–122, 2011.

NIELSEN, K. et al. Comparison of six DNA quantification methods. **Int Cong Ser**, v. 1288, p. 759–761, 2006.

OBIEZU, C. V. *et al.* Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 are markedly elevated in urine of patients with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 4, p. 1558–1561, 2001.

ORTUÑO, N. T.; MAY, P. **Forensic DNA Phenotyping: a review on SNP panels, genotyping techniques, and prediction models**. 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-2674028/v1>>.

PAULINO, R. D. M.; CONCEIÇÃO, T. DA S.; DECANINE, D. Análise de laudos periciais correspondentes a vítimas de estupro em Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Crimin**, v. 6, n. 2, p. 38–42, 2017.

POMA, A. *et al.* A qPCR-duplex assay for sex determination in ancient DNA. **PloS one**, v. 17, n. 6, p. e0269913, 2022.

RAO, A. R.; MOTIWALA, H. G.; KARIM, O. M. A. The discovery of prostate-specific antigen. **BJU intern**, v. 101, p. 5–10, 2007.

RATHOD, N. V. Literature Review: Forensic Analysis or Identification of Semen. **Int Med Legal Rep J**, p. 71–80, 2021.

RAWAL, L. *et al.* 46,XX males with SRY gene translocation: cytogenetics and molecular characterization. **J Rare Dis**, v. 3, n. 1, 2024.

RHIE, A. *et al.* The complete sequence of a human Y chromosome. **Nature**, v. 621, p. 344–354, 2023.

RIBPG - REDE INTEGRADA DE BANCOS DE PERFIS GENÉTICOS. **XVIII Relatório da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG): Dados estatísticos e resultados – Nov/2022 a Mai/2023**. Brasília: RIBPG, 2023.

ROCCAZZELLO, A. M. *et al.* Simultaneous estimation of a Y-specific fragment, an X-specific fragment and sex determination of forensic studies in real-time PCR. **Forensic Sci Int**, v. 146 Suppl, p. S165-6, 2004.

RODRIGUES, E. L.; GARRIDO, R. G. Polimorfismos genéticos e STRs. *In*: DIAS FILHO, C. R. *et al.* **Introdução à Genética Forense**. Campinas: Editora Millennium, 2020. cap 2, p. 13-39.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 1. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

- SANTOS, F. R.; PANDYA, A.; TYLER-SMITH, C. Reliability of DNA-based sex tests. **Nat Genet**, v. 18, n. 2, p. 103, 1998.
- SAWAYA, M. C. T.; ROLIM, M. R. S. Antígeno específico da próstata em fluidos biológicos: aplicação forense. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 2, 2004.
- SUTTIPASIT, P. Forensic spermatozoa detection. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 40, n. 4, p. 304–311, 2019.
- TAO, Y. *et al.* Comparison of analytical sensitivity and efficiency for SARS-CoV-2 primer sets by TaqMan-based and SYBR Green-based RT-qPCR. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 106, n. 5–6, p. 2207–2218, 2022.
- TAJADINI, M.; PANJEHPOUR, M.; JAVANMARD, S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. **Adv Biomed Res**, v. 3, n. 1, p. 85, 2014.
- TEIXEIRA, W. R. G. A importância do Swab na Perícia de Estupro. **IMESC**, n. 1, 1998.
- THANGARAJ, K.; REDDY, A. G.; SINGH, L. Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? **Int J Legal Med**, v. 116, n. 2, p. 121–123, 2002.
- TOSELLI, M.; PACHECO, A. C.; DIAS FILHO, C. R. PSA positivo, espermatozoides ausentes: vale a tentativa de obtenção de perfil genético masculino? **Rev Bras Crimin**, v. 8, n. 2, p. 51–57, 2020.
- UNUMA, K. *et al.* The proportion of false-positives in positive Seratec® prostate-specific antigen SemiQuant test results in postmortem screening for seminal fluid. **Leg Med**, v. 62, n. 102243, p. 102243, 2023.
- WALSH, S. J. Legal perceptions of forensic DNA profiling part I: a review of the legal literature. **Forensic Sci Int**, v. 155, n. 1, p. 51–60, 2005.
- WIEGAND, P.; SCHÜRENKAMP, M.; SCHÜTTE, U. DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. **Int J Legal Med**, v. 104, n. 6, p. 359–360, 1992.
- WOODLING, B. A.; KOSSORIS, P. D. Sexual misuse: Rape, molestation, and incest. **Pediatr Clin North Am**, v. 28, n. 2, p. 481–499, 1981.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/LONDON SCHOOL OF HYGIENE AND TROPICAL MEDICINE. **Preventing intimate partner and sexual violence against women: taking action and generating evidence**. Geneva: World Health Organization, 2010.
- YEN, P. H. *et al.* The human X-linked steroid sulfatase gene and a Y-encoded pseudogene: evidence for an inversion of the Y chromosome during primate evolution. **Cell**, v. 55, n. 6, p. 1123–1135, 1988.
- YU, H.; DIAMANDIS, E. P. Prostate-specific antigen in milk of lactating women. **Clin Chem**, v. 41, n. 1, p. 54–58, 1995.

## ANEXO 1 - Parecer do Delegado Geral da Polícia Civil do Espírito Santo referente à solicitação do uso das amostras do Laboratório de Biologia Forense.



GABINETE DO DELEGADO GERAL DA POLÍCIA CIVIL



DESPACHO:

REF: E-DOCS 2022-WR31P

Trata-se de CI/SESP/PC/SPTC/DLF/SLBF N° 33/2022 da lavra da PC POC Cristina Winkler, na qual solicita o uso da coletânea de amostras do Laboratório de Biologia Forense da Polícia Civil do Estado do Espírito Santo para a realização de projeto de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito – UFES.

Considerando que a coleta do material será realizada sem qualquer prejuízo em relação à integridade das amostras, a partir do segundo semestre de 2022 e no ano de 2023;

Considerando que o projeto passará pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFES, conforme as normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96, II.4);

Considerando o registro da servidora de que se responsabiliza pelos aspectos éticos e desenvolvimento da pesquisa, conforme se verifica à peça #2;

Considerando que o Chefe do Departamento de Laboratório Forense, bem como o Exmo. Superintendente se manifestaram favoravelmente ao pedido, conforme se verifica às peças #4 e #7.

Considerando que a participação dos servidores em cursos de capacitação e em programas de mestrado valoriza o servidor, além de propiciar a melhoria da qualidade dos serviços prestados;

Ante o exposto, defiro o pedido formulado pela requerente.

Encaminhe-se à SPTC para conhecimento e ciência à requerente.

Vitória/ES, 27 de maio de 2022.

**JOSÉ DARCY SANTOS ARRUDA**  
Delegado-geral da Polícia Civil/ES

mcp

**INFORMAÇÕES DO DOCUMENTO**

Documento capturado em 30/05/2022 18:16:22 (HORÁRIO DE BRASÍLIA - UTC-3)  
por MARIANA CUNHA PINHEIRO LOZER (ESCRIVAO DE POLICIA - GAB-DGPC - PCES - GOVES)  
Valor Legal: CÓPIA SIMPLES | Natureza: DOCUMENTO DIGITALIZADO  
Conferência: CONFERIDO COM DOCUMENTO CÓPIA SIMPLES EM SUPORTE PAPEL.

A disponibilidade do documento pode ser conferida pelo link: <https://e-docs.es.gov.br/d/2022-1WVJH3>

## ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO ESPÍRITO  
SANTO - CCS/UFES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DETECÇÃO DE DNA MASCULINO EM AMOSTRAS DE CRIMES SEXUAIS POR PCR EM TEMPO REAL.

**Pesquisador:** Iuri Drumond Louro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 61094622.3.0000.5060

**Instituição Proponente:** Centro de Ciências da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.622.741

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se o presente projeto de mestrado em biotecnologia da UFES, de um estudo prospectivo. Esse projeto tem como objetivo criar metodologias para detectar, por PCR em Tempo Real, fragmentos de cromossomo Y em amostras de suabe vaginal e anal de mulheres vítimas de suposto estupro. Esse trabalho irá testar e comparar três ensaios diferentes de PCR em Tempo Real duplex (qPCR-duplex) com diferentes pares de primers dos genes STS (gene da esteroide sulfatase, localizado no cromossomo X), que será utilizado como controle positivo, e TSPY (gene da proteína testicular específica ligada ao cromossomo Y), que irá detectar a presença do cromossomo Y nas amostras. A coleta das amostras de suabe vaginal e anal de mulheres vítimas de suposto estupro será realizada por um Perito Oficial Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo (PCES) durante sua rotina de trabalho, que encaminhará uma alíquota da amostra biológica à UFES. Serão coletadas cerca de duzentas (n=200) amostras, amostras essas que já tenham sido analisadas pela perícia e que seriam descartadas. As amostras serão identificadas numericamente somente para controle do estudo sem qualquer correlação com os dados dos casos da investigação criminal. O processamento e análise das amostras serão realizados no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM/UFES). Nenhuma informação referente às vítimas ou ao seu caso será coletada nem avaliada por este estudo.

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468, prédio da direção do Centro de Ciência da Saúde, segundo andar  
**Bairro:** S/N **CEP:** 29.040-091  
**UF:** ES **Município:** VITORIA  
**Telefone:** (27)3335-7211 **E-mail:** cep.ufes@hotmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO ESPÍRITO  
SANTO - CCS/UFES**



Continuação do Parecer: 5.622.741

**Objetivo da Pesquisa:**

De acordo com o pesquisador responsável, os objetivos da pesquisa são:

“Objetivo Primário: Este projeto visa comparar e validar metodologias de detecção de DNA masculino através da análise de fragmentos de cromossomo Y, por PCR em Tempo Real, em amostras de suabe vaginal e anal de mulheres vítimas de suposto estupro. Além disso, objetiva-se avaliar se os métodos propostos poderiam ser implementados na rotina das Polícias Técnico-Científicas como testes alternativos nos casos em que o resultado foi negativo para a pesquisa de sêmen.

Objetivo Secundário: Testar e comparar três ensaios diferentes de PCR em Tempo Real duplex (qPCR-duplex) com diferentes pares de primers dos genes STS (gene da esterolde sulfatase, localizado no cromossomo X), que será utilizado como controle positivo, e TSPY (gene da proteína testicular específica ligada ao cromossomo Y), que irá detectar a presença do cromossomo Y nas amostras.”

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com o pesquisador responsável, os riscos e benefícios do projeto são:

“ Riscos: O trabalho proposto pode apresentar riscos em relação ao uso do material biológico, uma vez que pode haver invasão de privacidade, divulgação de dados confidenciais, uso das amostras para novas pesquisas sem a devida autorização, comoção a partir da divulgação dos resultados e descarte inadequado do material biológico. Esses riscos serão amenizados pelo fato de que não haverá coleta de dados qualitativos das vítimas e de que as amostras não serão identificadas com nenhuma informação que possa relacioná-las às vítimas, cabendo à Polícia Civil a detenção de todas as informações. Além disso, os pesquisadores envolvidos no projeto assinaram um Termo de Confidencialidade e Sigilo. As amostras serão descartadas após o uso conforme as normas da ANVISA. Em relação aos pesquisadores, os riscos de contaminação presentes são mitigados por procedimentos e protocolos de rotina no laboratório.

Benefícios: Essas metodologias podem ser capazes de aumentar as chances de detecção de material genético masculino em amostras forenses degradadas. Por isso, poderiam ser implementadas pelas Polícias Técnico-Científicas nos casos em que a triagem foi negativa para a presença de sêmen, aumentando, assim, as chances de elucidação de casos de estupro.”

Os riscos e benefícios estão de acordo com a Res. CNS N° 466/12.

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468, prédio da direção do Centro de Ciência da Saúde, segundo andar  
**Bairro:** S/N **CEP:** 29.040-091  
**UF:** ES **Município:** VITORIA  
**Telefone:** (27)3335-7211 **E-mail:** cep.ufes@hotmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO ESPÍRITO  
SANTO - CCS/UFES**



Continuação do Parecer: 5.622.741

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa justifica dispensa do TCLE, porque nenhuma informação referente às vítimas ou ao seu caso será coletada nem avaliada por este estudo, uma vez que serão utilizadas apenas alíquotas de amostras que já tenham sido analisadas pela perícia e que seriam descartadas. Cabe à Polícia Civil do Espírito Santo (PCES) a detenção dos dados da investigação criminal. Há prévia autorização e interesse por parte da PCES para a utilização das amostras e o desenvolvimento desta pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

No projeto "DETECÇÃO DE DNA MASCULINO EM AMOSTRAS DE CRIMES SEXUAIS POR PCR EM TEMPO REAL", do pesquisador Iuri Drumond Louro, constam os seguintes documentos:

- Folha de rosto: apresentada e adequada.
- Projeto detalhado: apresentado e adequado.
- Termo de Sigilo e Confidencialidade: apresentado e adequado.
- Termo de anuência da instituição onde a pesquisa será realizada: apresentado e adequado.
- Regulamento do Biorrepositório: apresentado e adequado.
- Orçamento: apresentado e adequado.
- Cronograma: apresentado e atualizado, início previsto para 10/10/2022.

Os termos de apresentação obrigatória estão em conformidade com a Resolução CNS 466/12.

**Recomendações:**

O projeto não apresenta pendências.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto não apresenta pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1985026.pdf	23/08/2022 20:43:44		Acelto
Outros	TERMO_DE_SIGILO_E_CONFIDENCIALIDADE.pdf	23/08/2022 20:40:16	Iuri Drumond Louro	Acelto

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468, prédio da direção do Centro de Ciência da Saúde, segundo andar  
**Bairro:** S/N **CEP:** 29.040-091  
**UF:** ES **Município:** VITORIA  
**Telefone:** (27)3335-7211 **E-mail:** cep.ufes@hotmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO ESPÍRITO  
SANTO - CCS/UFES**



Continuação do Parecer: 5.622.741

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	REGULAMENTACAO_BIORREPOSITO RIO.pdf	23/08/2022 20:37:33	Iuri Drumond Louro	Acelto
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinada.pdf	31/07/2022 21:18:25	Iuri Drumond Louro	Acelto
Outros	Declaracao_Uso_e_destino_material_da_dos.pdf	31/07/2022 21:14:40	Iuri Drumond Louro	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisaMestradoCristinaWinkler.pdf	26/07/2022 19:48:13	CRISTINA WINKLER	Acelto
Outros	AutorizacaoDLF.pdf	23/07/2022 11:36:25	CRISTINA WINKLER	Acelto
Outros	AutorizacaoSPTC.pdf	23/07/2022 11:35:52	CRISTINA WINKLER	Acelto
Outros	AutorizacaoPCES.pdf	23/07/2022 11:35:06	CRISTINA WINKLER	Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

VITORIA, 02 de Setembro de 2022

Assinado por:

**Maria Helena Montelro de Barros Miotto  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468, prédio da direção do Centro de Ciência da Saúde, segundo andar  
**Bairro:** S/N **CEP:** 29.040-091  
**UF:** ES **Município:** VITORIA  
**Telefone:** (27)3335-7211 **E-mail:** cep.ufes@hotmail.com

### ANEXO 3 - TABELA GERAL DOS RESULTADOS DE SPTZ, PSA, QUANTIFICAÇÃO DO Y E DAS AMPLIFICAÇÕES

Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continua)

CÓDIGO	SUABE	SPTZ	PSA	QUANTIFICAÇÃO Y	STS158(Y)/STS89(X)	TSPY119(Y)/STS89(X)	TSPY67(Y)/STS95(X)	AMELY
CW1	Vaginal	+	n/a	0,009258	-/+	-/+	+/+	-
CW4	Vaginal	+	n/a	0,039145	+/+	+/+	+/+	-
CW5	Anal	+	n/a	0,128387	-/+	+/+	+/+	n/a
CW6	Vaginal	-	+	0,024858	-/+	-/+	-/+	-
CW7	Vaginal	+	n/a	0,900123	+/+	+/+	+/+	-
CW8	Vaginal	+	n/a	0,001217	-/+	-/+	-/+	-
CW9	Vaginal	+	n/a	1,482924	+/+	+/+	+/+	+
CW10	Anal	-	+	0,00316	-/+	-/+	+/+	-
CW11	Vaginal	+	n/a	0,002937	+/+	+/+	+/+	-
CW12	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW13	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW14	Vaginal	-	-	0,00223	-/+	-/+	+/+	-
CW15	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-

Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)

CÓDIGO	SUABE	SPTZ	PSA	QUANTIFICAÇÃO Y	STS158(Y)/STS89(X)	TSPY119(Y)/STS89(X)	TSPY67(Y)/STS95(X)	AMELY
CW16	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW17	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW18	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW21	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW22	Vaginal	-	-	0,57226	-/+	+/+	+/+	+
CW23	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW24	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW25	Vaginal	+	n/a	0,063347	-/+	+/+	+/+	+
CW26	Vaginal	+	n/a	0,036583	-/+	+/+	+/+	-
CW27	Vaginal	+	n/a	0,002593	-/+	-/+	+/+	-
CW28	Vaginal	+	n/a	0,002667	-/+	+/+	-/+	-
CW29	Vaginal	+	n/a	0,035936	-/+	+/+	+/+	-
CW32	Vaginal	-	-	0,001566	-/+	-/+	-/+	-
CW33	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-

Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)

<b>CÓDIGO</b>	<b>SUABE</b>	<b>SPTZ</b>	<b>PSA</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO Y</b>	<b>STS158(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY119(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY67(Y)/STS95(X)</b>	<b>AMELY</b>
CW36	Vaginal	-	-	0,004728	-/+	-/+	-/+	-
CW37	Vaginal	-	+	0,003154	-/+	+/+	+/+	+
CW38	Vaginal	-	+	0,000608	-/+	-/+	-/+	-
CW39	Vaginal	-	-	0,001043	-/+	-/+	-/+	-
CW40	Vaginal	-	-	0,001626	-/+	-/+	-/+	-
CW42	Vaginal	-	-	0,001616	-/+	-/+	-/+	-
CW43	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW44	Vaginal	+	n/a	0,071946	-/+	+/+	+/+	+
CW45	Anal	+	n/a	0,008327	+/+	+/+	+/+	-
CW46	Vaginal	+	n/a	0,013189	-/+	+/+	+/+	-
CW47	Vaginal	-	-	0,001526	-/+	+/+	+/+	-
CW48	Anal	-	-	0,006962	-/+	-/+	-/+	-
CW49	Vaginal	-	+	0,006049	-/+	+/+	+/+	-
CW50	Vaginal	-	+	0,450839	+/+	+/+	+/+	+
CW51	Anal	-	+	0	-/+	-/+	-/+	-

**Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)**

<b>CÓDIGO</b>	<b>SUABE</b>	<b>SPTZ</b>	<b>PSA</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO Y</b>	<b>STS158(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY119(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY67(Y)/STS95(X)</b>	<b>AMELY</b>
CW52	Vaginal	-	-	0,011815	-/+	-/+	-/+	-
CW53	Anal	-	-	0,000571	-/+	+/+	-/+	-
CW54	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW55	Anal	-	+	0,000277	-/+	-/+	-/+	-
CW56	Vaginal	+	n/a	0,007632	-/+	+/+	-/+	-
CW57	Anal	-	+	0,000629	-/+	-/+	-/+	-
CW58	Anal	+	n/a	0,003855	-/+	+/+	+/+	-
CW59	Vaginal	+	n/a	0,016632	-/+	+/+	+/+	+
CW60	Vaginal	+	n/a	0,561642	-/+	+/+	+/+	+
CW61	Vaginal	+	n/a	0,009825	-/+	+/+	+/+	-
CW62	Anal	+	n/a	0,001462	-/+	+/+	-/+	-
CW63	Vaginal	+	n/a	0,037331	+/+	+/+	+/+	+
CW64	Vaginal	+	n/a	0,991507	-/+	+/+	+/+	+
CW65	Vaginal	+	n/a	0,01015	-/+	+/+	+/+	-
CW66	Anal	+	n/a	0,012062	-/+	+/+	+/+	+

Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)

CÓDIGO	SUABE	SPTZ	PSA	QUANTIFICAÇÃO Y	STS158(Y)/STS89(X)	TSPY119(Y)/STS89(X)	TSPY67(Y)/STS95(X)	AMELY
CW67	Vaginal	+	n/a	0,186198	-/+	+/+	+/+	+
CW68	Vaginal	+	n/a	0,006815	-/+	+/+	+/+	-
CW70	Anal	-	-	0,000602	-/+	-/+	-/+	-
CW71	Vaginal	+	n/a	0,019384	-/+	+/+	+/+	+
CW72	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW74	Vaginal	-	+	0,001218	-/+	-/+	-/+	-
CW75	Vaginal	-	-	0,00058	-/+	-/+	-/+	-
CW77	Vaginal	-	-	0,01696	-/+	+/+	+/+	-
CW78	Anal	-	-	0,001032	-/+	-/+	-/+	-
CW79	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW80	Anal	+	n/a	0,011846	+/+	+/+	+/+	-
CW81	Vaginal	+	n/a	0,947438	+/+	+/+	+/+	+
CW82	Vaginal	+	n/a	0,016642	-/+	+/+	+/+	+
CW83	Anal	+	n/a	0,001247	-/+	+/+	+/+	-
CW84	Anal	-	-	0,001302	-/+	-/+	-/+	-

**Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)**

<b>CÓDIGO</b>	<b>SUABE</b>	<b>SPTZ</b>	<b>PSA</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO Y</b>	<b>STS158(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY119(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY67(Y)/STS95(X)</b>	<b>AMELY</b>
CW85	Vaginal	-	-	0,025001	-/+	+/+	+/+	-
CW86	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW88	Vaginal	-	-	0,000201	-/+	-/+	-/+	-
CW89	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW90	Vaginal	-	+	0	-/+	-/+	-/+	-
CW91	Anal	-	+	0,001336	-/+	-/+	-/+	-
CW92	Vaginal	-	+	0,137111	-/+	+/+	+/+	+
CW93	Anal	-	+	0,000391	-/+	-/+	-/+	-
CW95	Vaginal	-	-	0,000244	-/+	-/+	-/+	-
CW96	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW97	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW98	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW99	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW100	Vaginal	-	+	0	-/+	-/+	-/+	-
CW101	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-

**Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)**

<b>CÓDIGO</b>	<b>SUABE</b>	<b>SPTZ</b>	<b>PSA</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO Y</b>	<b>STS158(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY119(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY67(Y)/STS95(X)</b>	<b>AMELY</b>
CW102	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW103	Vaginal	+	n/a	0,147277	-/+	+/+	+/+	+
CW104	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW105	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW106	Vaginal	+	n/a	0,00285	-/+	+/+	-/+	-
CW107	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW108	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW109	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW110	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW111	Vaginal	-	+	0,000405	-/+	+/+	-/+	-
CW112	Anal	-	+	0,000117	-/+	-/+	-/+	-
CW113	Vaginal	-	-	0,000429	-/+	-/+	-/+	-
CW114	Vaginal	-	-	0,000209	-/+	-/+	-/+	-
CW115	Anal	-	-	0,004349	-/+	+/+	+/+	-
CW116	Vaginal	-	+	0,029447	-/+	+/+	+/+	+

**Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)**

<b>CÓDIGO</b>	<b>SUABE</b>	<b>SPTZ</b>	<b>PSA</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO Y</b>	<b>STS158(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY119(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY67(Y)/STS95(X)</b>	<b>AMELY</b>
CW117	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW118	Vaginal	+	n/a	0	-/+	-/+	-/+	-
CW119	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW120	Anal	-	-	0,000778	-/+	-/+	-/+	-
CW121	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW123	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW124	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW125	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW126	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW127	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW128	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW129	Vaginal	-	-	0,000427	-/+	-/+	-/+	-
CW130	Vaginal	-	-	0,00394	-/+	+/+	+/+	-
CW131	Anal	-	-	0,002172	-/+	+/+	-/+	-
CW132	Vaginal	-	-	0,00206	-/+	-/+	-/+	-

Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)

CÓDIGO	SUABE	SPTZ	PSA	QUANTIFICAÇÃO Y	STS158(Y)/STS89(X)	TSPY119(Y)/STS89(X)	TSPY67(Y)/STS95(X)	AMELY
CW134	Vaginal	-	+	0	-/+	-/+	-/+	-
CW135	Vaginal	+	n/a	0,004716	-/+	+/+	+/+	-
CW137	Vaginal	-	-	0,002055	-/+	+/+	+/+	-
CW138	Anal	-	-	0,000124	-/+	-/+	-/+	-
CW139	Vaginal	-	-	0,000502	-/+	-/+	-/+	-
CW140	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW141	Vaginal	+	n/a	0,036871	+/+	+/+	+/+	+
CW142	Anal	-	+	0,000506	-/+	-/+	+/+	-
CW143	Vaginal	+	n/a	0,417484	+/+	+/+	+/+	+
CW144	Vaginal	+	n/a	0,230497	-/+	+/+	+/+	+
CW145	Anal	+	n/a	0,006148	-/+	+/+	+/+	-
CW146	Vaginal	+	n/a	0,001319	-/+	+/+	+/+	-
CW147	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW148	Vaginal	+	n/a	0,10117	-/+	+/+	+/+	+
CW149	Anal	-	+	0,00032	-/+	-/+	-/+	-

**Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)**

<b>CÓDIGO</b>	<b>SUABE</b>	<b>SPTZ</b>	<b>PSA</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO Y</b>	<b>STS158(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY119(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY67(Y)/STS95(X)</b>	<b>AMELY</b>
CW150	Vaginal	+	n/a	0,002967	-/+	+/+	+/+	-
CW151	Vaginal	-	-	0,000336	-/+	-/+	-/+	-
CW152	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW153	Vaginal	+	n/a	0,98149	+/+	+/+	+/+	+
CW154	Anal	-	+	0	-/+	-/+	-/+	-
CW155	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW156	Anal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW157	Vaginal	-	-	0,551088	+/+	+/+	+/+	+
CW158	Vaginal	-	-	0,000145	-/+	-/+	-/+	-
CW159	Anal	-	-	0,001314	-/+	-/+	-/+	-
CW160	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	n/a
CW161	Anal	-	-	0,000353	-/+	-/+	-/+	n/a
CW162	Vaginal	+	n/a	0,045624	-/+	+/+	+/+	-
CW164	Vaginal	-	-	0,001139	-/+	-/+	-/+	-
CW165	Anal	-	-	0,001724	-/+	-/+	-/+	-

**Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (continuação)**

<b>CÓDIGO</b>	<b>SUABE</b>	<b>SPTZ</b>	<b>PSA</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO Y</b>	<b>STS158(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY119(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY67(Y)/STS95(X)</b>	<b>AMELY</b>
CW166	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW167	Vaginal	-	-	0	-/+	-/+	-/+	-
CW169	Vaginal	-	-	0,005194	-/+	+/+	+/+	-
CW170	Anal	-	-	0,000682276	-/+	-/+	-/+	-
CW171	Vaginal	-	+	0,004294868	-/+	+/+	+/+	-
CW172	Vaginal	-	+	0,064640678	-/+	+/+	+/+	+
CW173	Vaginal	-	+	0,80848515	+/+	+/+	+/+	+
CW174	Vaginal	10	n/a	0,046148	+/+	+/+	+/+	+
CW175	Vaginal	>11	n/a	2,014,549	+/+	+/+	+/+	+
CW176	Vaginal	>11	n/a	0,083191	-/+	+/+	+/+	+
CW177	Vaginal	>11	n/a	0,021263	-/+	+/+	+/+	+
CW178	Vaginal	3	n/a	0,00095	-/+	+/+	+/+	-
CW179	Vaginal	>11	n/a	0,003772	-/+	+/+	+/+	-
CW180	Anal	>11	n/a	0,013541	+/+	+/+	+/+	+
CW181	Vaginal	2	n/a	0,004137	-/+	-/+	-/+	-

**Tabela geral dos resultados de SPTZ, PSA, quantificação do Y e das amplificações (conclusão)**

<b>CÓDIGO</b>	<b>SUABE</b>	<b>SPTZ</b>	<b>PSA</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO Y</b>	<b>STS158(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY119(Y)/STS89(X)</b>	<b>TSPY67(Y)/STS95(X)</b>	<b>AMELY</b>
CW182	Vaginal	>11	n/a	0,436555	-/+	+/+	+/+	+
CW183	Vaginal	2	n/a	0,00024	-/+	-/+	-/+	-
CW184	Vaginal	4	n/a	0,001106	-/+	-/+	-/+	-
CW185	Vaginal	>11	n/a	0,072012	+/+	+/+	+/+	+
CW186	Anal	9	n/a	0,034239	+/+	+/+	+/+	+
CW187	Vaginal	2	n/a	0,006556	-/+	+/+	+/+	-
CW188	Vaginal	>11	n/a	0,51016	+/+	+/+	+/+	+
CW189	Anal	7	n/a	0,008572	-/+	+/+	+/+	-
CW190	Vaginal	>11	n/a	0,013711	-/+	+/+	+/+	+
CW191	Vaginal	2	n/a	0,001354	-/+	-/+	-/+	-
CW192	Vaginal	7	n/a	0,041665	-/+	+/+	+/+	+
CW193	Vaginal	>11	n/a	0,010277	-/+	+/+	+/+	-
CW194	Vaginal	1	n/a	0,06571	-/+	+/+	+/+	+
CW196	Vaginal	2	n/a	0,000712	-/+	+/+	+/+	-

Legenda: (-): Negativo para amplificação; (+): Positivo para amplificação; n/a: não foi realizado o teste na amostra.